

**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**



**PAPEL DE CAVEOLINA-1 EN PROCESOS DE POLARIZACION  
CELULAR Y EN MIGRACION DIRECCIONAL**

**Memoria presentada por *Araceli Grande García* para optar al grado de Doctor.**

**Licenciada en Ciencias Biológicas**

**Director:**

**Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso**

**Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)**





## CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TESIS

El Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso CERTIFICA que la doctoranda Araceli Grande García ha desarrollado y concluido su trabajo de Tesis Doctoral sobre “PAPEL DE CAVEOLINA-1 EN PROCESOS DE POLARIZACION CELULAR Y EN MIGRACION DIRECCIONAL.” bajo su supervisión, inicialmente en el *Scripps Research Institute* (La Jolla, California, EEUU), y durante los últimos cuatro años en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, con la financiación de una beca de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

En Madrid, a 26 de Mayo de 2008

Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso  
Jefe de Grupo  
Laboratorio de Señalización por Integrinas  
Departamento de Biología Vascular e Inflamación  
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)





*A mi familia*  
*A Jon.*



## **AGRADECIMIENTOS**

*Tan esperado este momento, y ahora no sé ni cómo empezar a daros las gracias a todos los que me habéis ayudado y apoyado de una forma u otra en esta etapa de mi vida. Todo el sacrificio de la tesis ha merecido la pena, aunque solo sea por la gente a la que he tenido oportunidad de conocer durante estos años. Entre todos me habéis ayudado no sólo a formarme como científica, sino también a madurar y crecer como persona.*

*En primer lugar, he de agradecer todo el esfuerzo, apoyo y paciencia que me ha dedicado mi director de tesis, Miguel Ángel del Pozo. Gracias por todo lo que me has enseñado este tiempo, por enseñarme a pensar como científica y a desenvolverme por mí misma. Y sobre todo, gracias por toda la confianza que has depositado en mí durante estos años, y cómo no, por toda la atención que me diste en San Diego, y por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Scripps.*

*Y hablando de San Diego, quería agradecer a toda la gente que conocí allí y que han hecho que guarde tan buen recuerdo de aquellos meses de estancia. Arian, gracias por darme tanto cariño, y por estar ahí tan cerca aunque nos separen tantos kilómetros. Gracias Nazilla, por haberme echado una mano con el paper, espero que ya hayas encontrado tu lugar en el mundo. Gracias al “grupo iraní”, y al “grupo español” por haberme dado tan buena acogida.*

*Quiero dar las gracias también a Juan Miguel Redondo, por “apadrinarme” cuando estaba “huérfana de jefe”, y a todo su grupo, por haberme acogido durante mis primeros pasos por el CNIC, especialmente a Antonio R. y a Sara, por haber sido mis maestros en esos meses, gracias por vuestro tiempo y paciencia; a Dolo, compañera de sufrimientos y alegrías, niña, gracias por haber estado ahí en los momentos difíciles, que aunque te guste hablar tanto, sabes escuchar como nadie. Por supuesto a las nuevas adquisiciones de Juanmi, María, la iguanera, qué pena que llegases al CNIC justo al final de mi tesis, que desde el primer momento que hablé contigo ya me sentía como si te conociese de toda la vida; Van, que para mí sigues siendo de la funda, gracias por tener siempre una sonrisa y una palabra amable, y por esa fuerza que transmites.*

*Gracias también a Campanero, que durante poco tiempo también me estuvo dando asilo en su labo, y por supuesto, a sus chicos de entonces, Irene, Jesús y Lorena, que desde el primer día me integrasteis en el grupo como a una más.*

*Por supuesto, agradecer la ayuda de todo mi grupo, me alegro de haber podido compartir laboratorio con gente como vosotros. Ana, gracias por toda la ayuda desinteresada que me has dado, por esa tranquilidad que siempre inspiras, y por todos los momentos de desconexión, voy a echar de menos tus miradas cómplices; Foronda, gracias por tu entusiasmo y tu buen carácter, es un gusto trabajar con gente como tú; Marta y Olivia, espero que disfrutéis de vuestra tesis tanto como yo o más, ha sido genial compartir labo y poyata con vosotras; Sara, esa pedazo de técnico, me alegro mucho de haber podido trabajar contigo; Inma, gracias por compartir conmigo tus inquietudes científicas; Raffaele, grazie mille per le tue aiuto (es así?), Asier, gracias por tus consejos científicos; y las incorporaciones más recientes, Susana, Jacky, Dacil, me habría gustado coincidir más con vosotros; y finalmente, Antonio José, que estuviste poco tiempo en el labo, pero el suficiente para dejar huella, quiiiiillooooo.*

*Gracias a todo el labo de Alicia, a la gente que empezó conmigo en Tres Cantos...Salomón, gracias por tu apoyo y tu buen rollo, gracias por hacerme reír tanto, sigo echando de menos las conversaciones que teníamos durante las comidas; Laurilla, los cafés ya no son los mismos sin ti, gracias por tu simpatía y tu sinceridad; Bea, qué buenos momentos en Tres Cantos, fue un placer trabajar contigo. Y a los de ahora, gracias Angela, por esos breaks, por ayudarme a desconectar en los momentos de estrés, y Pilar, gracias por tu cariño y tu compañerismo, por tener siempre tanta alegría en el cuerpo, incluso en los momentos de más estrés; Vane, majeta, que es una suerte tenerte como compañera de labo y de farras, gracias por tu comprensión y por crear tan buen ambiente en el labo, y fuera de él; Antonio, hace falta más gente como tú, gracias por tu confianza y el apoyo me has dado, espero que triunfes allá donde vayas ahora, que lo mereces como nadie; y por supuesto, agradecer a los que se han*

*incorporado un poco más tarde, Victoria, Rubén, Aga...gracias a todos por los buenos ratos que hemos pasado juntos, que hacéis que a veces me sienta más de vuestro grupo que del mío!*

*Iñigo, gracias por haber seguido ahí, por estar siempre tan al tanto de mis correrías, gracias por tu amistad.*

*Esther, apañá, siempre me has hecho ver el lado positivo de todas las cosas, espero que volvamos a ser vecinas algún día, de labo y de casa!*

*Y no me olvido de la gente que conocí en Ámsterdam, en especial Johan, gracias por todo lo que me has ayudado y enseñado, por implicarte tanto en mi proyecto, y por la hospitalidad que me has dado. Y Coert, fuiste una vía de escape entre tanto y tanto trabajo, gracias por hacerme más agradables las largas horas que pasé en vuestro labo. No sé qué habría hecho sin vosotros dos.*

*Enara, doña, ya ves que todo llega, espero estar en la tuya antes de irme de postdoc, aunque se te tuerzan las cosas, que te quede claro que tú vales un montón, espero poder darte todo el ánimo que me has dado tú a mí; Felix, Patricia, gracias por vuestro apoyo también, aunque os mandasen lejos, que sepáis que los tres seguís teniendo un hueco en nuestro labo, al menos en nuestros eventos del labo, cenas varias, el famoso hicking...*

*Esther secre, has marcado un antes y un después en este nuestro centro, gracias por estar siempre tan dispuesta a ayudar, en el trabajo y fuera de él, por repartir tanta alegría y simpatía. Y te tomo la palabra, espero verte en Londres!!*

*Y ese pedazo de lab manager, Antonio Jesús, o como todos te llamamos (o al menos yo sigo llamándote), “el Niño”, gracias por hacer que las cosas funcionen mejor en el departamento y aguantar todas nuestras peticiones y problemas siempre con buen humor.*

*Gracias a las niñas de Citometría, Raquel, Elvira, Pilar, por hacerme tan amenas las largas horas de microscopio y FACS.*

*Y gracias Juan Carlos, por haberme ayudado tan eficientemente con mis videos y análisis, creo que has sido de las mayores pérdidas que ha sufrido el CNIC.*

*Y no me olvido de los que empezaron conmigo en TC y me han ido precediendo en la tesis...gracias en especial a Dani, Sara, Inma, y sobre todo Tania, por vuestro compañerismo, por vuestros consejos y por vuestro apoyo en todo momento.*

*Noe, Marta, Bea, Isa y Joaquín, esta tesis va dedicada a vosotros también, por ayudarme a desconectar de todo esto, tan necesario como las horas de trabajo, y por haber compartido conmigo tantos buenos momentos. Bética, Yoli, Ana, Tania, eso va también por vosotras, y gracias por esas largas conversaciones tan constructivas y necesarias, por seguir ahí a pesar de todos los vaivenes de la vida.*

*Barbara, Dav, Berni, Guillermo, Ana, Paloma...llegó mi momento! la siguiente tú, Bar. Gracias a todos por compartir conmigo vuestras alegrías y penurias, de las tesis varias que han ido pasando, y de la vida en general, gracias por acogerme tan bien!*

*Y cómo olvidarme de la gente de la fundación y co., en especial Alfi, Gema, Felix, Vero, Julio, Van (otra vez!)...esas casitas rurales.....Avo, Luci, A3, Vir, Bea, Charlie, Cris y demás, que sois un montón, gracias a todos por vuestros ánimos y por estar al tanto de mi tesis, me alegro que Jon tenga la suerte de contar con unos compañeros como vosotros!*

*Quería dedicar la tesis especialmente a toda mi familia, pero sobre todo a mis padres, por esforzarse en comprender esto de la ciencia y todo lo que conlleva, por vuestro apoyo incondicional, por haberme ayudado durante esta etapa de mil maneras diferentes, por no haberme fallado nunca; y a mis hermanos, Edu y Elena, que aunque ahora estéis a kilómetros de distancia, habéis seguido todo esto de cerca, gracias por apoyarme en todo momento, ojalá hubieseis podido estar conmigo en estas fechas, con las peques...*

*Y por supuesto, gracias a “mi otra familia”, Juan, M<sup>a</sup> Jesús, Marilu, Eddy, Emilio, Ana, gracias por haberos preocupado tanto por mi tesis y por cuidarme tan bien cada vez que voy para allá.*

*Por último, pero el más importante, Jon, que te voy a decir que no te haya dicho ya. Gracias por darme tanta fuerza y confianza en mí misma, por levantarme el ánimo cuando lo he necesitado, por compartir todo conmigo, y hacerme reír cada día. Esta tesis es tanto tuya como mía, ya lo sabes.*





## **RESUMEN/SUMMARY**





## RESUMEN

El desarrollo embrionario, la angiogénesis, la cicatrización de heridas y la metástasis son procesos que implican una migración celular en respuesta a cambios en el medio extracelular. Con el fin de determinar el papel que juega caveolina-1 (Cav1) en la motilidad celular, se han empleado fibroblastos extraídos de ratones deficientes en caveolina-1 (Cav1<sup>-/-</sup>) y diversas líneas celulares que no expresan Cav1. En este estudio se muestra que las células Cav1<sup>-/-</sup> presentan un defecto en el establecimiento de la polaridad celular y en la arquitectura de las fibras de estrés, así como alteraciones en la maduración y reciclaje de las estructuras de adhesión y un incremento en la actividad de protrusión de membrana. Estas alteraciones están en consonancia con la disminución de la actividad de RhoA y el aumento de las actividades de Rac1 y Cdc42 detectadas en ausencia de Cav1. Además estas células pierden su direccionalidad intrínseca en los desplazamientos aleatorios en ausencia de estímulos externos y muestran una respuesta quimiotáctica alterada. Se ha observado también un retraso en el cierre de heridas *in vitro*, que se corresponde con un retardo en la cicatrización de heridas dérmicas en ratones Cav1<sup>-/-</sup>. Apoyando estos datos, se ha detectado un mayor reclutamiento de Rac1 a la membrana plasmática que promueve la formación de lamelas periféricas durante la migración de las células Cav1<sup>-/-</sup>. En ausencia de Cav1, los microdominios de membrana ricos en colesterol (CEMMs) son retenidos en la superficie celular, incluso tras despegar las células del sustrato, llevando a una regulación positiva de las vías de señalización que son activadas por Rac1. Para restablecer el fenotipo normal se requiere Cav1, y además es dependiente de la fosforilación de esta proteína en Y14. Fosfo-Cav1 modula negativamente la actividad de Src. De acuerdo con esto, se ha detectado una hiperactividad de Src en las células Cav1<sup>-/-</sup>. Tanto la inhibición de Src como de p190RhoGAP revierte el fenotipo de las células Cav1<sup>-/-</sup>, sugiriendo que Cav1 regula los niveles de Rho-GTP y las subsiguientes funciones en citoesqueleto a través de la inactivación de la vía Src/p190RhoGAP. Por otro lado, las células Cav1<sup>-/-</sup> muestran mayor adhesión a varias proteínas de la matriz extracelular y mayores niveles de integrina  $\beta$ 1 en conformación activa. Resultados preliminares indican que la quinasa Src y el componente del “complejo de activación de integrinas” talina participan en la mayor afinidad de las integrinas por sus ligandos en ausencia de Cav1. En conjunto, todos estos resultados resaltan la importancia de Cav1 para el establecimiento de la polarización celular durante la migración direccional por medio de la coordinación de vías de señales que implican a Src y las RhoGTPasas.

## SUMMARY

Development, angiogenesis, wound healing and metastasis all involve the movement of cells in response to changes in the extracellular environment. To determine what kind of role caveolin-1 plays in cell migration, we have used fibroblasts from knockout mice and cell lines deficient in caveolin-1 expression. In this study we show that caveolin-1 deficient cells lose normal cellular polarization and stress fibres architecture, show increased numbers of immature and shorter-lived focal adhesions, and increased protrusive activities at cell edges. Decreased RhoA and increased Rac1 and Cdc42 GTPase activities in caveolin-1 deficient cells account for these cytoskeletal defects. Moreover, caveolin-1 deficient cells lose internal directional persistency of migration and show an impaired response to external chemotactic stimuli. Consistently, wounded monolayers of caveolin-1 deficient cells exhibit a delay in wound closure *in vitro*, which correlates with a retarded skin wound healing in caveolin-1 deficient animals. Supporting these alterations, there is an increase in Rac1 plasma membrane targeting, which promotes the formation of peripheral lamellae in migrating caveolin-1 deficient cells. We postulate that in the absence of caveolin-1, the cholesterol-enriched-membrane-microdomains (CEMMs) are retained in the cell surface, even after detaching the cells from the substrate, leading to an up-regulation of the pathways downstream of Rac1. The normal phenotype is mediated by caveolin-1 and requires phosphorylation on Tyr 14, which contributes to physiologic down-modulation of Src activity. Accordingly, Src is hyperactivated in caveolin-1 null fibroblasts. Src and p190RhoGAP inactivation in these cells restores the normal phenotype, suggesting that caveolin-1 regulates Rho-GTP loading and subsequent cytoskeletal function through inactivation of the Src/p190RhoGAP pathway. On the other hand, caveolin-1 deficient cells show increased adhesion to several extracellular matrix proteins and elevated levels of active  $\beta 1$  integrin (high affinity conformation). Preliminary results suggest that Src kinase and talin, which is a component of the integrin-activating complex, might contribute to up-regulate the ligand-binding affinity of the integrins in the absence of caveolin-1. Altogether, these findings highlight the relevance of caveolin-1 in the establishment of cell polarity during directional migration through coordination of Src kinase and Rho GTPases signalling.

# INDICE

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Migración celular .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Las RhoGTPasas .....</b>  | <b>10</b> |
| 1.2.1      | Papel de Rho en migración .....  | 11        |
| 1.2.2      | Papel de Rac en migración.....   | 12        |
| 1.2.3      | Papel de Cdc42 en migración .....  | 13        |
| 1.2.4      | Interrelación entre GTPasas: antagonismo entre las actividades de Rac y Rho.....   | 14        |
| <b>1.3</b> | <b>Las integrinas: principales receptores implicados en migración .....</b>  | <b>14</b> |
| 1.3.1      | Estructura de las integrinas .....   | 15        |
| 1.3.2      | Clasificación de las integrinas .....  | 16        |
| 1.3.3      | Regulación de la actividad de las integrinas .....   | 16        |
| 1.3.4      | Integrinas como componentes de las adhesiones focales.....   | 18        |
| 1.3.5      | Mecanismos de regulación de las RhoGTPasas por integrinas.....   | 19        |
| 1.3.5.1    | Regulación de Rac y Cdc42 .....  | 20        |
| 1.3.5.2    | Regulación de Rho .....  | 21        |
| <b>1.4</b> | <b>Caveolas y caveolina-1 .....</b>  | <b>22</b> |
| 1.4.1      | Definición de caveolas .....   | 22        |
| 1.4.2      | Propiedades estructurales de caveolina-1 .....   | 24        |
| 1.4.3      | Propiedades funcionales de caveolina-1 .....   | 25        |
| 1.4.4      | Implicación de caveolina en la motilidad celular.....  | 26        |
| 1.4.5      | Controversia en el papel regulador de Cav1 en migración .....  | 27        |
| 1.4.6      | Modelos animales en el estudio funcional de la caveolina. ....   | 28        |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4</b>   | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Caveolina-1 es necesaria para la adquisición de un fenotipo polarizado en la célula .....</b>   | <b>47</b> |
| 4.1.1      | La ausencia de Cav1 provoca anomalías en la estructura del citoesqueleto de actina y en el patrón de los complejos de adhesión.....                              | 47        |
| 4.1.2      | Los fibroblastos deficientes en Cav1 tienen alterada la maquinaria de polarización celular.....  | 49        |
| <b>4.2</b> | <b>Caveolina-1 modula la actividad de las RhoGTPasas y afecta a los procesos biológicos en los que intervienen estas GTPasas. ....</b>                           | <b>50</b> |
| 4.2.1      | Los fibroblastos Cav1 <sup>-/-</sup> presentan alteraciones en la actividad de las RhoGTPasas ..   | 50        |
| 4.2.2      | Caveolina-1 regula el reclutamiento de Rac a la membrana plasmática.....   | 51        |
| 4.2.2.1    | La internalización de CEMMs mediada por Cav1 afecta a la translocación de Rac a la membrana plasmática .....   | 51        |
| 4.2.2.2    | Las células Cav1 <sup>-/-</sup> son incapaces de silenciar las vías de señalización activadas por Rac tras la pérdida de adhesión a la matriz extracelular ..... | 53        |
| 4.2.3      | Localización subcelular de Rac en fibroblastos Cav1 <sup>-/-</sup> adheridos a FN.....   | 55        |
| 4.2.4      | Consecuencias biológicas de los defectos de activación de las RhoGTPasas.....  | 56        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>4.3</b> | <b>La migración direccional se encuentra alterada en las células deficientes en Cav1..</b>                                  | <b>60</b>  |
| 4.3.1      | Migración direccional en ausencia de estímulos externos .....   | 60         |
| 4.3.2      | Respuesta quimiotáctica.....  | 60         |
| <b>4.4</b> | <b>Src y p190RhoGAP están implicados en la pérdida de polarización celular de los fibroblastos deficientes en Cav1.....</b> | <b>63</b>  |
| <b>4.5</b> | <b>Las células Cav1<sup>-/-</sup> muestran alteraciones en las integrinas a distintos niveles.....</b>                      | <b>67</b>  |
| <b>4.6</b> | <b>Los ratones deficientes en Cav1 tienen alterada su capacidad de cicatrización de herida.....</b>                         | <b>71</b>  |
| <b>5</b>   | <b>DISCUSIÓN.....</b>   | <b>73</b>  |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>7</b>   | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>91</b>  |
| <b>8</b>   | <b>ANEXO I: VIDEOMICROSCOPÍA (CD).....</b>  | <b>107</b> |
| <b>9</b>   | <b>ANEXO II: PUBLICACIONES.....</b>   | <b>111</b> |

## **ABREVIATURAS**



|              |   |
|--------------|---|
| <b>ARNhc</b> | ácido ribonucleico horquillado corto  |
| <b>ARNi</b>  | ácido ribonucleico de interferencia   |
| <b>BSA</b>   | <i>bovine serum albumine</i> , albúmina de suero bovino   |
| <b>Cav1</b>  | caveolina-1   |
| <b>CEMM</b>  | <i>cholesterol-enriched membrane microdomain</i> , dominios de membrana ricos en colesterol                     |
| <b>CSD</b>   | <i>caveolin-scaffolding domain</i> , dominio de anclaje de caveolina  |
| <b>CSK</b>   | <i>C-terminal Src kinase</i> , quinasa del extremo carboxilo de Src   |
| <b>CTxB</b>  | subunidad B de la toxina colérica   |
| <b>DMEM</b>  | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>   |
| <b>EDTA</b>  | ácido etilén-diamino-tetra-acético  |
| <b>EF</b>    | <i>elliptical factor</i> , factor elíptico  |
| <b>EGF-R</b> | <i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento epidérmico                         |
| <b>EGTA</b>  | ácido etilén glicol-bis(2-aminoetileter)-N, N, N', N'-tetraacético  |
| <b>FA</b>    | <i>focal adhesion</i> , adhesión focal  |
| <b>FAK</b>   | <i>focal adhesion kinase</i> , quinasa de adhesión focal  |
| <b>FB</b>    | <i>fibrillar adhesion</i> , adhesión fibrilar   |
| <b>FBS</b>   | <i>fetal bovine serum</i> , suero bovino fetal  |
| <b>FITC</b>  | <i>fluorescein isothiocyanato</i> , iso-tiocianato de fluoresceína  |
| <b>FN</b>    | fibronectina  |
| <b>FRET</b>  | <i>Förster resonance energy transfer</i> , transferencia de energía por resonancia descrita por Theodor Förster |
| <b>FX</b>    | <i>focal complex</i> , complejo focal   |
| <b>GAP</b>   | <i>GTPase-activating protein</i> , proteína activadora de GTPasa  |
| <b>GDI</b>   | <i>GDP-dissociation inhibitor</i> , inhibidor de disociación de GDP   |
| <b>GDP</b>   | <i>guanosine di-phosphate</i> , guanosín difosfato  |
| <b>GEF</b>   | <i>Guanosine nucleotide exchange factor</i> , factor de intercambio de nucleótidos de guanosina                 |
| <b>GFP</b>   | <i>Green Fluorescent Protein</i> , proteína verde fluorescente  |
| <b>GST</b>   | <i>Glutathion-sulphur-transferase</i> , transferasa de azufre a glutatión                                       |
| <b>GTP</b>   | <i>guanosine tri-phosphate</i> , guanosín trifosfato  |
| <b>HEPES</b> | ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacina-etanosulfónico   |
| <b>HRP</b>   | <i>horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano  |
| <b>ID</b>    | índice de direccionalidad   |
| <b>MBP</b>   | <i>myelin basic protein</i> , proteína básica de la mielina   |

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>MEC</b>       | matriz extracelular   |
| <b>MEF</b>       | <i>Mouse embryonic fibroblast</i> , fibroblasto de embrión de ratón                           |
| <b>MLCK</b>      | <i>myosin light chain kinase</i> , quinasa de la cadena ligera de miosina                     |
| <b>MLEC</b>      | <i>Mouse lung endothelial cell</i> , célula endotelial de pulmón de ratón                     |
| <b>MMP</b>       | <i>Matrix Metalloproteinase</i> , metaloproteasa de matriz                                    |
| <b>MTOC</b>      | <i>microtubule organizing center</i> , centro organizador de microtúbulos                     |
| <b>eNOS</b>      | <i>endothelial nitric oxide synthase</i> , óxido nítrico sintasa endotelial                   |
| <b>PAGE</b>      | <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en geles de poliacrilamida         |
| <b>PAK</b>       | <i>p-21 activated kinase</i> , quinasa activa p21   |
| <b>PBS</b>       | <i>phosphate buffered saline</i> , tampón fosfato salino                                      |
| <b>PBD</b>       | <i>PAK binding domain</i> , dominio de unión a PAK  |
| <b>PI3K</b>      | <i>phosphatidyl-inositol-3 kinase</i> , fosfatidil-inositol-3 quinasa                         |
| <b>PMSF</b>      | <i>phenylmethanesulphonyl fluoride</i> , fenil metil sulfonil fluoruro                        |
| <b>Polybrene</b> | <i>1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide</i> , <i>hexadimethrine bromide</i> |
| <b>RBD</b>       | <i>Rhotekin binding domain</i> , dominio de unión a Rhotekina                                 |
| <b>SDS</b>       | <i>sodium dodecyl sulfate</i> , dodecil sulfato sódico  |
| <b>TBS</b>       | <i>Tris buffered saline</i> , solución salina tamponada con Tris                              |
| <b>TRITC</b>     | tetra-metil-rodamina isotiocianato  |
| <b>WGA</b>       | <i>wheat germ agglutinin</i> , aglutinina de germen de trigo                                  |
| <b>WT</b>        | <i>wild-type</i> , fenotipo salvaje   |



# **1 INTRODUCCIÓN**



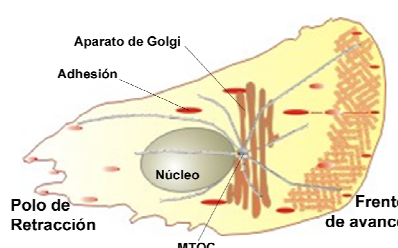
## 1.1 Migración celular

La migración celular es un proceso complejo de gran relevancia tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Desempeña un papel fundamental en numerosos procesos biológicos como son el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, la reparación de tejidos dañados y la angiogénesis. La desregulación de la migración está implicada en diversas patologías tales como defectos congénitos, aterosclerosis, artritis y metástasis (142, 187). Por citar un ejemplo, un incremento en la motilidad celular puede desencadenar un comportamiento invasivo en los carcinomas, que llevaría al desarrollo de fenómenos metastáticos (47).

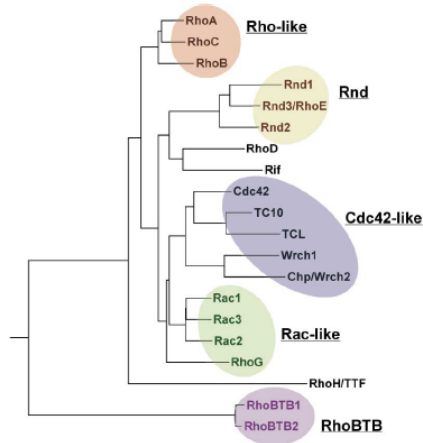
De forma simplificada, podemos entender la migración como un fenómeno compuesto por múltiples pasos secuenciales, durante los cuales son precisas la integración y coordinación espacio-temporal de numerosas vías de señalización (142, 162). En primer lugar la célula emite extensiones de membrana hacia el frente de avance. Estas protrusiones son estabilizadas mediante el establecimiento de estructuras de anclaje a la matriz extracelular. A continuación se produce una translocación de la célula en la dirección de desplazamiento y finalmente tiene lugar una retracción del polo posterior de la célula con el desensamblaje de las estructuras de adhesión. Durante todo el proceso de migración en la célula se da una polarización, tanto a nivel morfológico como intracelular, acompañada de la reorientación de orgánulos como el aparato de Golgi y el centro organizador de microtúbulos (*microtubule organizing center*, MTOC), que se colocan entre el núcleo y el frente de avance (187). (Figura 1)

Hay dos parámetros a tener en cuenta en la migración celular, a saber, la velocidad y la dirección de desplazamiento. Podemos distinguir dos tipos de migración direccional. Una es la denominada quimiotaxis, que es aquella migración dirigida que se da en respuesta a un estímulo externo quimioatractivo. El otro tipo se conoce como “direccionalidad intrínseca” o “persistencia direccional” en migración, y es definida como la tendencia que tienen las células a seguir desplazándose en una misma dirección durante un periodo de tiempo en ausencia de estímulos externos (67).

Para que se produzca el movimiento celular, se requieren toda una serie de cambios coordinados en el citoesqueleto de actina-miosina, en los sitios de adhesión de la célula al sustrato y en el tráfico de membranas, entre otros eventos. En todos estos pasos intervienen numerosas moléculas de señalización, destacando las RhoGTPasas, pero también otras proteínas como las metaloproteasas, que facilitan el desplazamiento celular por medio de la degradación de la matriz; las integrinas, principales receptores de adhesión; o la caveolina-1, objeto de este estudio, que será definida más adelante (Figura 1) (67, 109, 187).



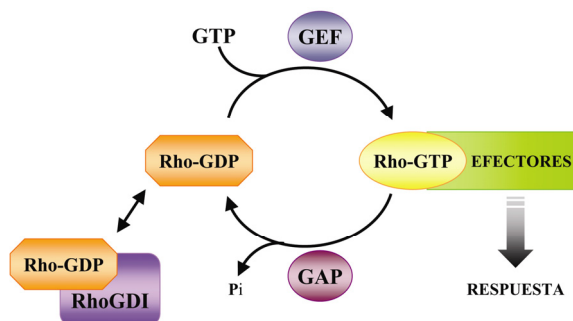
cabo su función reguladora (Figura 3). El ciclo de activación e inactivación de las RhoGTPasas está controlado por 3 tipos de moléculas:



**Figura 2. Clasificación de los miembros de las GTPasas de la familia Rho.** Figura adaptada de Burridge and Wennerberg, Cell 2004.

- los factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF, *Guanosine nucleotide exchange factor*), los cuales catalizan el intercambio de GDP por GTP, llevando a la GTPasa a su estado activo (156).
- las proteínas activadoras de GTPasa (GAP, *GTPase-activating protein*), que aceleran la actividad GTPasa intrínseca de estas proteínas, que pasan por tanto a su estado inactivo con GDP (6).
- los inhibidores de disociación de GDP (GDI, *GDP-dissociation inhibitor*), que inhiben el intercambio de GDP por GTP, manteniendo la GTPasa en su conformación inactiva (116).

Entre los efectores de las GTPases se encuentran quinasas de serina/treonina, quinasas de tirosina, lipasas, oxidasas y proteínas de anclaje. Estudios estructurales indican que muchos de estos efectores permanecen en conformación inactiva hasta su unión a las GTPasas. Por otro lado, se piensa también que las GTPasas pueden actuar reclutando proteínas diana a determinadas localizaciones.



**Figura 3. Ciclo de activación/inactivación de las GTPasas de la familia Rho.** Las RhoGTPasas ciclan entre un estado activo, unidas a GTP, y un estado inactivo, unidas a GDP. La transición de un estado a otro está controlada por proteínas GEF, GAP y GDI. Sólo cuando la GTPasa está cargada con GTP es capaz de interactuar con sus efectores.

### 1.2.1 Papel de Rho en migración

Las proteínas de la subfamilia Rho regulan el remodelamiento del citoesqueleto y la movilidad celular. En concreto, la activación de Rho lleva al ensamblaje de filamentos

contráctiles de actina y miosina, y regula tanto la formación como la contracción de las fibras de estrés (133, 187). Asimismo, está implicada en la maduración de complejos focales a adhesiones focales, pero también controla el desensamblaje de las mismas (141). Uno de los mecanismos por los que podría estar induciendo la formación de adhesiones focales es de manera indirecta al promover la contracción de actina-miosina. Esto genera una tensión extracelular, que se ha descrito como uno de los principales factores que contribuye al ensamblaje de adhesiones focales (125, 143).

La actividad de Rho se concentra generalmente en el polo posterior de la célula, donde promueve la formación de fuerzas contráctiles. Sin embargo, utilizando técnicas de FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) se ha podido detectar Rho activado en el frente de avance de células migrando hacia un estímulo direccional, no así en células migrando aleatoriamente (76, 126). En estos trabajos se obtuvieron evidencias de que Rho estaría contribuyendo también a la formación de protrusiones de membrana y es esencial para una migración dirigida eficiente.

Uno de los principales inhibidores de Rho, y que requiere mención especial en la presente tesis doctoral por ser objeto de estudio, es p190RhoGAP. Se trata de una proteína de 190 kDa que se activa por fosforilación mediada por estimulación con factores de crecimiento o por adhesión celular. Cuando esta proteína es fosforilada en tirosinas por quinasas como c-Src, p190 sufre un cambio conformacional que promueve su actividad GAP y, en consecuencia, ejerce su acción inhibitoria sobre Rho. La inactivación localizada de Rho por p190RhoGAP en respuesta a adhesión mediada por integrinas puede favorecer la motilidad de la célula por promover protrusión y polaridad celular (2, 94, 112).

### 1.2.2 Papel de Rac en migración

La activación de Rac promueve la polimerización de actina y está asociada con la formación de protrusiones de membrana en el frente de avance denominadas lamelipodios. Se ha detectado Rac activo tanto en los lamelipodios como en estructuras de ondulación de membrana denominadas “*ruffles*”. En estas zonas periféricas de la célula, Rac induce la nucleación de polímeros de actina a través de la proteína WAVE y del complejo Arp2/3 (70).

Los niveles de activación de Rac determinan el patrón de migración de las células. Se ha demostrado que un aumento en los niveles basales de Rac promueve la formación de lamelas periféricas que provoca un movimiento celular más aleatorio con frecuentes cambios de dirección debido a la falta de una única lamela dominante que determine el frente de avance. Por el contrario, una bajada en la actividad de Rac suele correlacionar con una mayor persistencia en la dirección de migración, ya que se inhibe la formación de lamelas laterales (121). Este papel de Rac en migración direccional tiene relevancia *in vivo*, ya que en ratones deficientes en Rac1 se ha registrado una migración alterada en los queratinocitos en ensayos de cicatrización de herida (182).

A parte de la función de Rac en la reorganización del citoesqueleto, hay evidencias de que interviene también en las primeras etapas de formación de los complejos focales (146). Se sabe que Rac favorece el reclutamiento de integrinas activas en los lamelipodios del frente de avance de la célula durante la migración, y en consecuencia, estas regiones desarrollan una adhesión más fuerte comparado con otras áreas de la superficie celular (73). De esta forma la activación de Rac estaría favoreciendo la formación de nuevas adhesiones en el polo anterior de la célula. Este supondría otro mecanismo por el cual Rac puede estar determinando un patrón de migración dirigida.

Uno de los efectores principales de Rac es PAK1 (p21-activated kinase), que fosforila y activa la quinasa LIM, y ésta a su vez fosforila e inhibe ADF/cofilina, proteína de unión a actina que estimula la disociación de monómeros de actina en el extremo del filamento. La quinasa LIM, al inactivar cofilina, atenúa el desensamblaje de filamentos de actina (16). Sin embargo, esta actividad debe estar muy controlada, ya que el desensamblaje de los filamentos de actina es necesario para la protrusión de lamelipodios durante la migración dirigida. Se ha descrito que cuando se sobreexpresa un mutante de quinasa LIM constitutivamente activo, en lugar de una única lamela polarizada, surgen multitud de lamelipodios donde se detecta fosfo-cofilina inactiva, y la célula pierde su polaridad (28). Estos resultados apoyan la hipótesis de la pérdida de migración direccional ante una hiperactivación de Rac.

### **1.2.3 Papel de Cdc42 en migración**

Al igual que Rac, la activación de Cdc42 lleva a la formación de extensiones de membrana, y es importante en polarización celular. Sin embargo, las protrusiones que genera son muy diferentes a las de Rac. Forma estructuras de actina polimerizada muy finas y alargadas que reciben el nombre de filopodios. La actividad de Cdc42 induce la nucleación de polímeros de actina a través del complejo Arp2/3, pero a diferencia de Rac, recluta y activa dicho complejo a través de la proteína N-WASP. Sin embargo, éste no es el único mecanismo de extensión de filopodios, puesto que células deficientes en N-WASP siguen formando estas estructuras en respuesta a la activación de Cdc42 (168). Esto lleva a pensar que WASP puede estar facilitando la formación de filopodios disparando la nucleación de filamentos en zonas localizadas del citoesqueleto, pero que en última instancia sean otros efectores los que desempeñen un papel más determinante en este proceso (100). Incluso se ha descrito en células epiteliales una vía de formación de filopodios independiente de Cdc42, inducida por una proteína llamada LPR1 (*lipid-phosphatase-related protein 1*) (163).

Por otro lado, Cdc42 es esencial para el establecimiento de la polarización celular. Son muchas las rutas de señalización que controlan este proceso, pero Cdc42 desempeña un papel central como coordinador de todas ellas, integrando una gran variedad de señales extra- e intracelulares con el fin de seleccionar el eje de polaridad apropiado a cada situación fisiológica

y tipo celular (41). Es responsable, por ejemplo, de situar el MTOC y el aparato de Golgi delante del núcleo, orientados hacia el frente de avance. Este hecho es fundamental para la migración dirigida de células de motilidad lenta, como son los fibroblastos y las células endoteliales (120, 142)

Por último, Cdc42 coopera con Rac en las primeras fases de formación de los complejos focales (146).

### **1.2.4 Interrelación entre GTPasas: antagonismo entre las actividades de Rac y Rho**

La actividad de Rho promueve la contractilidad celular, mientras que la activación de Rac lleva a la extensión de la membrana celular. El balance entre ambas actividades es determinante para el comportamiento migratorio de la célula. Al contrario de lo que se había postulado inicialmente, se tienen evidencias de que la activación de Rac lleva a una inhibición de Rho y viceversa (12, 81, 114, 147, 148). Esta regulación antagónica no es directa y lineal, sino que sucede a través de una complicada red de señales. Se ha publicado que tanto la activación de Rac como Cdc42 lleva a una reducción en la actividad de Rho independiente de Pak1 y de la JNK, ambas proteínas presentes en las vías efectoras de Rac (147). No obstante, la activación de PAK puede antagonizar indirectamente ciertas rutas por debajo de Rho, por ejemplo, mediante la fosforilación e inhibición de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK, *myosin light chain kinase*), que bloquearía la contracción de las fibras de estrés (148). Por otro lado se ha descrito un mecanismo por el cual la producción de radicales de oxígeno, consecuencia de la activación de Rac, lleva a la inhibición de una fosfatasa llamada LMW-PTP (*low molecular weight protein tyrosine phosphatase*), que regula negativamente p190RhoGAP. Como resultado se da un incremento en la actividad de p190RhoGAP, que a su vez lleva a la inhibición de Rho (110). Por su parte, RhoA puede suprimir la actividad de Rac por medio de la activación de uno de los GAPs específicos de Rac, FilGAP. Esta proteína GAP activada es reclutada a las zonas en protrusión de la célula, donde inhibe Rac restringiendo así la proyección de lamelas (114).

La complejidad de estas interrelaciones se extiende a otras RhoGTPasas, e incluso existen múltiples conexiones con otros miembros de la superfamilia de Ras (12). El balance adecuado entre las actividades de las diversas GTPasas es fundamental para el desarrollo de una respuesta migratoria eficiente.

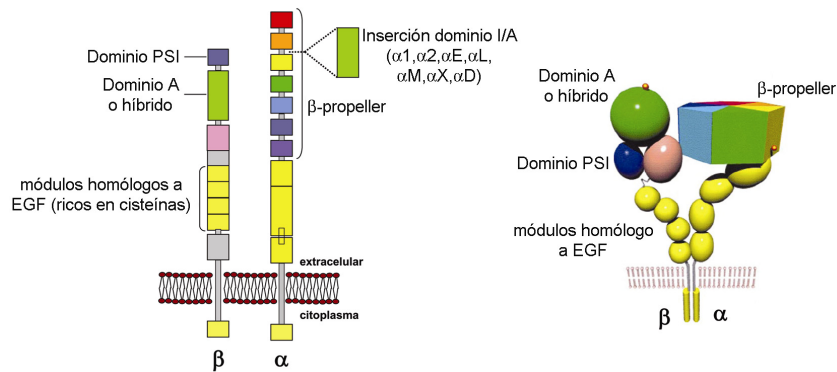
## **1.3 Las integrinas: principales receptores implicados en migración**

Los receptores de adhesión a la matriz extracelular son cruciales en la regulación de la actividad de las GTPasas y de otras rutas de señalización intracelular implicadas en la motilidad



de la célula. Entre ellos destacan las integrinas como principal familia de receptores de membrana implicados en adhesión y migración celular.

Las integrinas se expresan en prácticamente todos los tejidos y linajes celulares, estando involucradas en gran variedad de procesos, tales como el desarrollo embrionario, la adhesión leucocitaria a endotelio y su posterior extravasación hacia tejidos u órganos linfoides secundarios, la adhesión a células presentadoras de antígeno, la regulación de la proliferación celular y la diferenciación celular entre otros (68).



**Figura 4. Estructura de las integrinas.** (a) Organización por dominios de la estructura primaria de una integrina. PSI, “plexina, semaforina, integrina”. Figura adaptada de Mould, J Cell Sci 1996. (b) Representación esquemática de la estructura tridimensional de una integrina. Figura adaptada de Humphries, Biochem Soc Trans 2000.

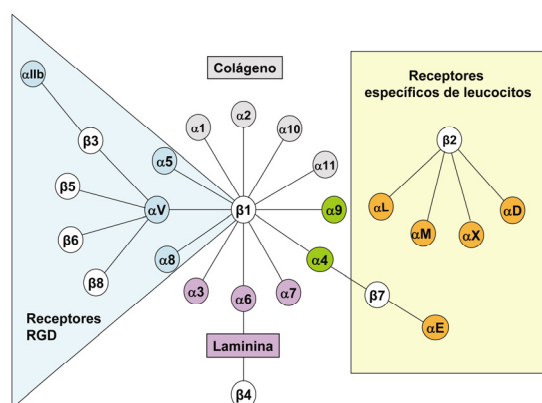
### 1.3.1 Estructura de las integrinas

Estructuralmente las integrinas son glicoproteínas transmembrana heterodiméricas constituidas por la asociación no covalente de una subunidad α (120-128 kDa) y una subunidad β (90-110 kDa). Por su extremo citoplasmático se unen a proteínas del citoesqueleto, mientras que por el dominio extracelular pueden reconocer proteínas de matriz extracelular, ligandos solubles y receptores presentes en la membrana de otras células. Hasta la fecha se han descrito 18 subunidades α y 8 subunidades β, cuya combinación da lugar al menos a 24 integrinas diferentes (Figura 5). La subunidad α está compuesta por 7 dominios homólogos con estructura de lámina β alrededor de un eje de pseudosimetría (modelo de *β-propeller*) (173), de los cuales las 3 o 4 últimas repeticiones pueden unir cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ). Al menos 8 subunidades α contienen una inserción de unos 200 residuos entre las repeticiones 2 y 3, conocida como dominio I/A de la subunidad α. La subunidad β contiene 4 regiones ricas en cisteínas homólogas a los módulos del factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) en el extremo carboxilo terminal. Y en el extremo amino terminal se encuentra el llamado dominio híbrido o dominio A, que presenta una serie de plegamientos por la presencia de puentes disulfuro y regiones de unión a cationes divalentes. Esta región susceptible de unir cationes, junto con secuencias localizadas en la estructura *β-propeller*, están relacionadas con la

unión de las integrinas con el ligando. Las colas citoplasmáticas de ambas subunidades son cortas, de unos 30-50 residuos. No obstante, desempeñan un papel clave en la señalización intracelular, así como en la modulación de la afinidad de las integrinas (66, 117, 180) (Figura 4).

### 1.3.2 Clasificación de las integrinas

Las integrinas se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios, que se recogen en la Figura 5. Según su especificidad de unión a ligando, la cual viene determinada por la subunidad  $\alpha$ , se agrupan en cuatro clases: aquellas que reconocen la secuencia RGD presente en moléculas como la fibronectina (FN) y la vitronectina; aquellas que se unen específicamente a laminina; las que reconocen colágeno; y finalmente, aquellas cuya expresión está restringida a leucocitos y que funcionan principalmente en adhesión intercelular. También pueden clasificarse en función de la subunidad  $\beta$ : la subfamilia  $\beta 1$ , constituida por 12 heterodímeros, que reconocen principalmente proteínas de la matriz extracelular; la subfamilia  $\beta 2$ , formada por 4 integrinas específicas de leucocitos; la subfamilia  $\beta 3$ , o citoadhesinas, formada por las glicoproteínas plaquetarias  $\alpha IIb\beta 3$  (gp IIb-IIIa) y el receptor de la vitronectina ( $\alpha v\beta 3$ ); y la subfamilia  $\beta 7$ , que consta de 2 miembros, específicos de leucocitos también (68).



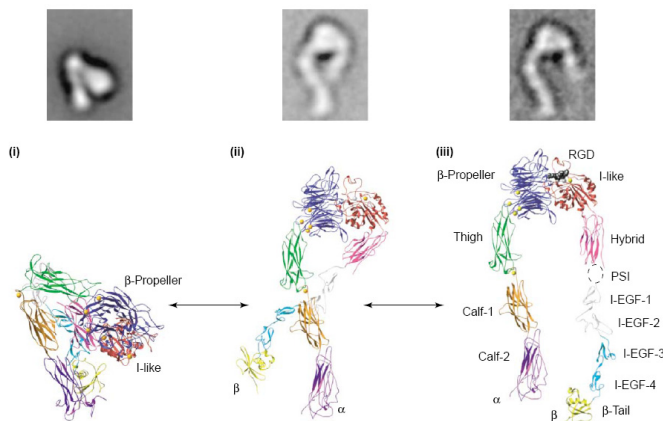
**Figura 5. Clasificación de la familia de las integrinas en mamíferos.** El esquema muestra las posibles combinaciones entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Cada subunidad  $\beta$  puede asociarse a diferentes subunidades  $\alpha$ . Se clasifican en función de la especificidad del ligando que unen: colágeno (gris), secuencia RGD presente en fibronectina y vitronectina (azul); laminina (morado); integrinas de expresión restringida a leucocitos (naranja). Figura adaptada de Hynes, Cell 2002.

### 1.3.3 Regulación de la actividad de las integrinas

Las integrinas pueden modificar de forma rápida y reversible su capacidad de unir ligandos, o lo que es lo mismo, su estado de activación. La actividad de las integrinas viene determinada por dos parámetros: la **afinidad** y la **avidez** al ligando (17, 65, 86, 105). Las variaciones en la afinidad son resultado de cambios conformacionales de la integrina, que llevan a modificaciones en el sitio de unión al ligando. Cuando las integrinas se encuentran en su conformación inactiva, de baja afinidad por el ligando, las colas citoplasmáticas de las dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están interaccionando entre sí. Esto provoca que los dominios extracelulares se encuentren replegados, con una topología de V invertida que bloquea la unión con el ligando (91). Por el contrario, cuando se produce la separación de las colas  $\alpha$  y  $\beta$  por acción de ciertas proteínas citoplasmáticas, los dominios extracelulares se despliegan y las integrinas adoptan una

conformación activa, en la que se favorece la interacción con el ligando (Figura 6) (65, 91, 105, 179, 180).

Por otro lado, la activación de las integrinas se puede dar por un aumento en la avidéz, sin que necesariamente se dé un cambio en la afinidad del receptor. Esto sucede por difusión y agrupación o “*clustering*” de las integrinas en determinados puntos de la membrana plasmática, permitiendo el establecimiento de interacciones multivalentes entre las integrinas y sus ligandos, que en conjunto generan una mayor fuerza adhesiva (Figura 36) (17, 68, 86).



**Figura 6. Cambios conformacionales de las integrinas relacionados con la regulación de la afinidad a ligando.** Modelo de regulación del estado de afinidad de las integrinas, en el que se observa la transición desde un estado de baja afinidad o conformación “plegada” (I) a un estado de alta afinidad o conformación “extendida” (III), pasando por una etapa de afinidad intermedia (II). Figura adaptada de Carman *et al.*, Curr Op Cell Biol 2003.

En resumen, la actividad adhesiva de las integrinas depende de dos factores: el estado conformacional del heterodímero (afinidad), y su densidad y localización topográfica en la membrana plasmática (avidéz). Dependiendo de la situación, se favorece un tipo de activación u otro. Se ha comprobado *in vitro* que la exposición de las integrinas a cationes divalentes como el  $Mn^{2+}$  induce un aumento en su afinidad (175), mientras que la presencia de ésteres de forbol provoca un aumento en la avidéz (7).

Las integrinas se caracterizan por su capacidad para transmitir información en las dos direcciones. Por un lado se da una señalización intracelular que modula la conformación de las integrinas y su grado de afinidad por el ligando (*inside-out signaling*, desde dentro hacia fuera). Y por otro lado, hay señales extracelulares desencadenadas por la unión del ligando que se transmiten al interior de la célula (*outside-in signaling*, desde fuera hacia dentro) (17, 180). La activación *inside-out* puede estar originada por unión de quimioquinas, factores de crecimiento u otros ligandos a sus correspondientes receptores, o por tratamientos con ésteres de forbol, que disparan cascadas de señalización que acaban confluyendo en un conjunto de proteínas que forman el llamado complejo de activación de integrinas (68). En este complejo destaca la talina, que suele encontrarse en el último paso de activación de la integrina (60). En ciertos casos ocurre que la activación de una integrina puede suprimir la función de otras integrinas en un fenómeno llamado inhibición trans-dominante (36).

En cuanto a la activación *outside-in*, se puede inducir por diversos métodos *in vitro*, entre los que destacan el tratamiento con cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$  y el  $Mn^{2+}$  (106), y el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra ciertos epítomos de integrinas (1, 107). Como consecuencia se dan los cambios conformacionales necesarios para la unión del ligando, tras la cual la señal se transmite al citoplasma por estimulación de diversas rutas de señalización implicadas en procesos tales como la motilidad celular.

### 1.3.4 Integrinas como componentes de las adhesiones focales

Las integrinas establecen un vínculo físico entre el citoesqueleto y la matriz extracelular. La unión con los filamentos de actina no es directa, sino a través de diversas proteínas que son reclutadas a los puntos donde se da la interacción con el sustrato, formando estructuras de adhesión macromoleculares, las cuales se engloban en 4 tipos: complejos focales (FX), adhesiones focales (o contactos focales) (FA), adhesiones fibrilares (FB) y podosomas (53, 200, 201). Cada una de ellas presenta una morfología y composición molecular característica (Tabla 1). Entre los numerosos componentes se encuentran tanto proteínas adaptadoras o de anclaje como moléculas de señalización, puesto que estas estructuras, además de anclar la célula al sustrato, transmiten señales en ambas direcciones (18). Para el reclutamiento de estas proteínas es necesaria tanto la activación como el *clustering* de las integrinas. En los bordes de los lamelipodios se suelen formar nuevas adhesiones por activación de integrinas  $\alpha v \beta 3$ , que conlleva primeramente el reclutamiento de talina y paxilina y una alta detección de proteínas fosforiladas en tirosina (pY), y después la incorporación de vinculina,  $\alpha$ -actinina, FAK y VASP, formando los complejos focales (200). Estos FXs pueden crecer y transformarse en FAs, estimulados por las fuerzas mecánicas derivadas de la contracción de actina-miosina (199). La formación de FAs se caracteriza por la incorporación de zyxina, y bajos niveles de tensina y viene acompañada por el ensamblaje de haces de actina. Estas FAs suelen situarse en los extremos de las fibras de estrés (200). En las FBs, la integrina predominante es  $\alpha 5 \beta 1$  y se detectan altos niveles de tensina en ellas, caracterizándose además por ser, en general, estructuras de mayor tamaño y por estar presentes en la zona ventral de la célula (23, 52, 200, 202). Finalmente, otra modalidad de adhesión es el podosoma, que se encuentra principalmente en osteoclastos y macrófagos. Se trata de estructuras cilíndricas de pequeño tamaño (0,5  $\mu m$  de diámetro) que contienen componentes propios de las FAs, como vinculina y actina, y otros específicos como la gelsolina y la dinamina, y que pueden derivar a estructuras de degradación de matriz (53, 92). Pese a todo lo descrito, no está totalmente clara la cinética de reclutamiento de las diferentes proteínas a las estructuras de adhesión, ni la existencia de marcadores diferenciales y por tanto específicos de cada una de ellas (78).

Para la motilidad celular es imprescindible una regulación espacio-temporal rigurosa tanto del ensamblaje como del desensamblaje de todas estas estructuras de adhesión. Las

tensiones mecánicas generadas por la contracción de fibras de estrés o bien por perturbaciones externas, parecen tener un papel central en la dinámica de las adhesiones (143). Asimismo, hay evidencias de que la fosforilación en tirosina de diversas proteínas, especialmente aquella mediada por FAK-Src, participa en la regulación de estas estructuras. Por un lado, contribuye al crecimiento de la adhesión por facilitar el reclutamiento de proteínas (mediante interacción de proteínas que contienen dominios SH2 con pY-proteínas), y por otro lado, participa en el reciclaje de las adhesiones por mecanismos no del todo claros (53, 188). El citoesqueleto de tubulina (71, 166) y la proteína reguladora de endocitosis dinamina (42) también se han implicado en el desensamblaje de las adhesiones. Es interesante señalar que en las distintas vías que regulan la reorganización de las adhesiones participan de una forma u otra las GTPasas de la familia Rho (70, 146, 191).

**Tabla 1. Características de las diferentes estructuras de adhesiones célula-matriz.** (Figura adaptada de Zaidel-Bar *et al.*, Biochem Soc Trans 2004 y Geiger *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol 2001).

| Propiedad/estructura        | Complejos focales   | Adhesiones focales  | Adhesiones fibrilares                  |
|-----------------------------|---|---|--|
| <b>Distribución celular</b> | Borde de lamelipodio  | Periferia celular   | Regiones centrales                     |
| <b>Morfología</b>           | Forma de punto  | Forma elongada u oval   | Forma fibrilar                         |
| <b>Tamaño</b>               | 1 $\mu\text{m}$   | 2-5 $\mu\text{m}$   | 1-10 $\mu\text{m}$                     |
| <b>Componentes típicos</b>  | Integrina $\alpha\text{v}\beta 3$<br>Paxilina<br>Vinculina<br>$\alpha$ -actinina<br>Talina<br>FAK<br>Proteínas fosforiladas en tirosina<br>VASP | Integrina $\alpha\text{v}\beta 3$<br>Paxilina<br>Vinculina<br>$\alpha$ -actinina<br>Talina<br>FAK<br>Proteínas fosforiladas en tirosina<br>VASP<br>Zyxina<br>Integrina $\alpha 5\beta 1$<br>Tensina | Integrina $\alpha 5\beta 1$<br>Tensina |
| <b>Inducido por</b>         | Rac   | Rho   | Rho (?)                                |

### 1.3.5 Mecanismos de regulación de las RhoGTPasas por integrinas.

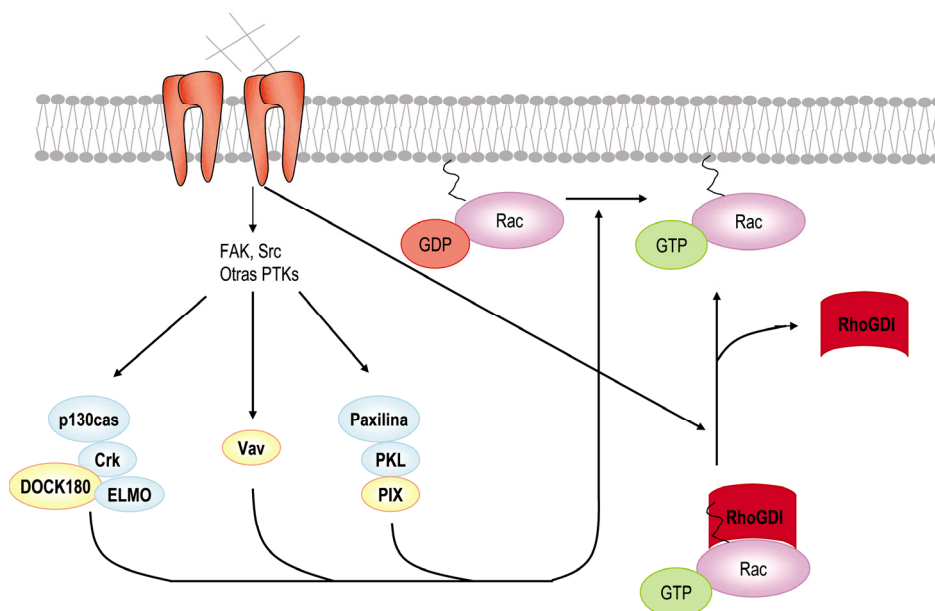
Hay evidencias de que las integrinas pueden estar influyendo en el estado de activación de Rho, Rac y Cdc42 (22, 64, 129, 138). Se ha observado que tras la adhesión de fibroblastos a fibronectina, se da una activación inmediata de Cdc42 y Rac, mientras que Rho sufre una inhibición inicial transitoria que va seguida de una fase de activación a tiempos más largos (129, 138), lo cual sugiere que estas GTPasas están reguladas por distintas vías. No obstante, las bases moleculares por las que las integrinas podrían estar modulando la activación de las diferentes RhoGTPasas no están bien definidas. De forma simplificada se suelen diferenciar 2 fases: una etapa temprana de adhesión en la que intervienen vías de señales que inducen protrusión celular

y una polimerización de actina muy dinámica, relacionadas con la activación de Rac y Cdc42; y una fase más tardía en la que se activaría Rho, llevando a la formación de fibras de estrés y el establecimiento de adhesiones focales más grandes y estables. No obstante, la respuesta intracelular a adhesión por integrinas es muy compleja y quedan muchas cuestiones confusas por desvelar (34, 158).

### 1.3.5.1 Regulación de Rac y Cdc42

Las integrinas pueden estar actuando sobre determinados GEFs y GAPs, modulando así indirectamente la actividad de las GTPasas. Por ejemplo, hay evidencias de que Vav1, un GEF de Rac expresado en células hematopoiéticas, se activa por fosforilación en tirosina tras la unión de las integrinas a su sustrato (21, 57, 198).

Hay otra proteína denominada p130cas que se localiza en adhesión focal y que también es fosforilada en tirosina como consecuencia de la activación de integrinas. Esta proteína fosforilada puede activar Rac a través de un complejo proteico constituido por Crk, ELMO y DOCK180 (19, 74, 75, 189). Esta última proteína ha sido identificada como un GEF de Rac, aunque poco convencional por faltarle los dominios en tandem DH/PH (*Dbl homology/Pleckstrin homology*) característicos de los GEFs de las GTPasas de la familia Rho (Figura 7) (11, 24). De hecho, junto a Zizimina (GEF de Cdc42), define una nueva familia de GEFs de Rho GTPasas (24, 96).



**Figura 7. Activación de Rac y Cdc42 mediada por integrinas.** En respuesta a la activación de integrinas, se activan diversas tirosina-quinásas, incluidas FAK y Src. Estas quinasas fosforilan diferentes sustratos, entre los que se encuentran proteínas adaptadoras (en azul) y GEFs (en amarillo), llevando a la activación de Rac y Cdc42 (sólo se muestra Rac). Adicionalmente, las integrinas pueden promover la translocación de Rac a la membrana plasmática, desde donde esta GTPasa queda disponible para poder interactuar con sus efectores. Figura adaptada de DeMali *et al.*, Curr Op Cell Biol 2003.



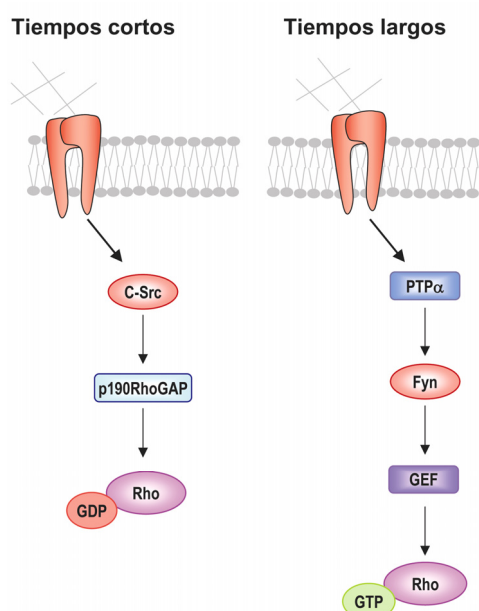
Se ha observado que las integrinas no sólo pueden influir sobre la activación de Rac y otras GTPasas en cuanto a su carga de GTP, sino que también pueden controlar la interacción de las mismas con sus correspondientes efectores (31). Aparte de la unión de GTP, Rac necesita estar asociada a determinadas regiones de la membrana plasmática para poder interaccionar con sus efectores. Hay cierta fracción de Rac que se encuentra retenida en el citoplasma unida a RhoGDI. Cuando la integrinas se activan, Rac es liberada y se puede asociar a la membrana desde donde iniciará sus cascadas de señalización (30). Esto mismo ocurre con Cdc42. Es importante indicar que Rac no se une a cualquier región de la membrana plasmática, sino que presenta una afinidad específica por unos microdominios ricos en colesterol (CEMM, *cholesterol-enriched membrane microdomain*), también conocidos como balsas lipídicas (de los que se hablará más adelante en la sección de “Caveolas y caveolina-1”). Se ha propuesto que las integrinas controlan la internalización de estos dominios de unión a Rac. Cuando las células se encuentran en suspensión, con las integrinas desactivadas, estos dominios son internalizados, impidiéndose así la interacción de Rac con sus proteínas efectoras (29). Esta dependencia de integrinas y la asociación específica a CEMMs han sido descritas también para el caso de las GTPasas Cdc42 y Rho (20, 30, 119).

### 1.3.5.2 Regulación de Rho

A cortos tiempos de adhesión sobre fibronectina se observa una supresión transitoria de la actividad de Rho (138), la cual está determinada por la activación de Src, FAK y p190RhoGAP mediada por integrinas (Figura 8) (2, 3, 139). En esta inhibición de Rho también está implicada paxilina. En respuesta a la activación de integrinas, paxilina es fosforilada en dos tirosinas. Una vez fosforilada, ésta puede unirse a dos dominios SH2 de p120RasGAP, desplazando a p190RhoGAP en su interacción con p120RasGAP. Este hecho se correlaciona con una bajada en la actividad de Rho (183). Sin embargo, esta inactivación de la GTPasa Rho sigue dándose en condiciones en las que paxilina no está fosforilada, por lo que éste no sería el único mecanismo. Y por otro lado, se ha descrito con posterioridad que p190RhoGAP mantiene su capacidad de inhibir Rho cuando se encuentra anclado a la membrana plasmática formando complejos con p120RasGAP (8). En cualquier caso, la fosforilación de p190RhoGAP vía Src y otras quinasas estaría desempeñando un papel importante en esta inhibición (3, 63).

Por otro lado, tras una activación prolongada de las integrinas se puede apreciar un aumento en la actividad de Rho. En esta respuesta tardía podrían estar cooperando otros receptores aparte de las integrinas, como es el sindecano-4 (150), aunque se ha visto que las integrinas por sí mismas son capaces de activar esta GTPasa. No obstante, la activación de Rho es compleja y se han observado respuestas diferentes con distintos tipos de integrinas. O'Connor y colaboradores muestran que la activación de  $\alpha 6 \beta 4$  lleva a la estimulación de Rho, mientras que la agrupación o *clustering* de integrinas  $\beta 1$  conlleva la inactivación de Rho (113).

Otro grupo observó que la sobreexpresión de  $\beta 3$  en células CHO (*Chinese hamster ovary*) provoca un aumento en los niveles de Rho-GTP cuando las células se encuentran adheridas a FN, mientras que la sobreexpresión de  $\beta 1$  en este sistema no lleva a la activación de Rho (99). Danen y colaboradores obtuvieron un resultado opuesto a éste empleando células deficientes en  $\beta 1$ . Re-expresando  $\beta 1$  en este sistema consiguen estimular la actividad de Rho en respuesta a adhesión sobre FN, mientras que con la sobreexpresión de  $\beta 3$  no observan activación de Rho (26). Aunque estos dos estudios tienen resultados contradictorios, ambos tienen en común el hallazgo de que el dominio extracelular de la cadena  $\beta$  parece desempeñar un importante papel en la especificidad de la respuesta intracelular que se genera tras la estimulación de la integrina (26, 99). Una explicación posible a esa controversia es que se utilizan sistemas celulares muy distintos, y es lógico pensar que los requerimientos de una integrina en particular pueden ser muy diferentes dependiendo del tipo celular (34).



**Figura 8. Regulación de la actividad de Rho por integrinas.** A tiempos cortos de adhesión, algunas integrinas pueden suprimir transitoriamente la actividad de Rho a través de una vía que implica a Src y p190RhoGAP. Con otras integrinas, o con las mismas a tiempos de adhesión más largos, se puede dar un incremento en los niveles de Rho-GTP como resultado de la activación de la tirosina-quinasa Fyn mediada por PTP $\alpha$ , que presumiblemente fosforila y activa GEFs de Rho. Figura adaptada de DeMali *et al.*, Curr Op Cell Biol 2003.

## 1.4 Caveolas y caveolina-1

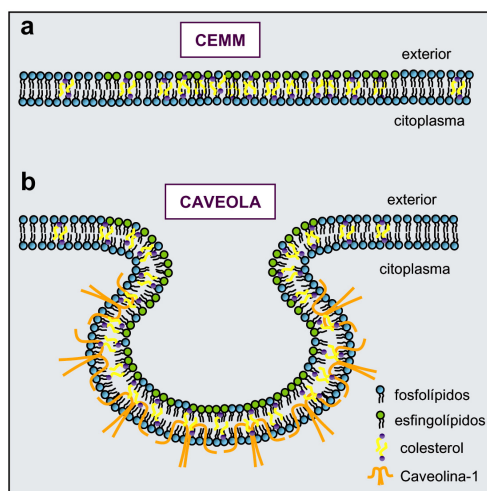
### 1.4.1 Definición de caveolas

Dentro del “mar” de fosfolípidos que forman las membranas biológicas se pueden distinguir unas “islas” rígidas en un estado físico más ordenado y enriquecidas en colesterol y esfingolípidos (glucoesfingolípidos y esfingomielina) que se han denominado “*lipid rafts*” o “balsas lipídicas” (10, 164), o también CEMMs (dominios de membrana ricos en colesterol). La composición de lípidos específica de estos microdominios de membrana les confiere resistencia a la solubilización en detergentes no iónicos a 4°C, como Tritón X-100, y una menor densidad que el resto de las membranas. Estas propiedades se han utilizado para caracterizar bioquímicamente los CEMMs (10, 88, 164). No obstante, dependiendo del método de estudio



utilizado, su composición, tamaño, vida media, etc. varía, lo que ha planteado dudas sobre su existencia en membranas celulares. Sin embargo, se ha demostrado su existencia en modelos de membrana, y distintas técnicas de microscopía han ofrecido evidencias de que la membrana plasmática es heterogénea, con multitud de dominios diferentes, algunos de los cuales dependen de colesterol (32, 61).

Las caveolas se han definido como microdominios de la membrana plasmática en forma de invaginación ricos en colesterol y esfingolípidos, con un tamaño comprendido entre 50 y 100 nm (Figura 9). Han sido consideradas tradicionalmente como una forma vesicular específica de los CEMMs (10, 164), y aunque hay proteínas que están en los dos tipos de estructuras, algunas son exclusivas de las balsas lipídicas y otras sólo están presentes en las caveolas (89).



**Figura 9. Organización de los CEMMs y las caveolas. (a) CEMMs.** La “fase líquida ordenada” con alto contenido en esfingolípidos (esfingomielina y glicosfingolípidos) está orientada al exterior celular y es rica en colesterol. La “fase líquida desordenada” se compone básicamente de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina). **(b) Caveolas.** Cuando Cav1 se inserta en las balsas lipídicas se forman invaginaciones a modo de cueva. Cav1 forma homo-oligómeros (simplificados en dímeros de color naranja), que otorgan la estructura tridimensional necesaria para formar las caveolas. Figura adaptada de Razani *et al.*, Pharmacol Rev 2002.

El principal componente proteico y estructural de las caveolas es la caveolina. Se han identificado tres miembros de la familia génica de la caveolina. El gen de Cav1 se compone de tres exones muy conservados en todas las especies y se han descrito dos isoformas, una predominante, Cav1 $\alpha$ , de 178 residuos, y una isoforma derivada de un segundo codón de iniciación de la traducción en la posición 32 de la secuencia, denominada Cav1 $\beta$ , de 147 residuos (153). Cav2 se compone también de tres exones, que codifican para una proteína de 162 residuos (152). Finalmente, el gen de Cav3 está compuesto por dos exones que codifican una proteína de 151 residuos (181). Cav1 y Cav3 presentan una alta homología en su secuencia aminoacídica (195).

Las caveolas se encuentran en la mayoría de las células, siendo especialmente abundantes en adipocitos, células endoteliales, fibroblastos y células de tejido muscular (195). La expresión de Cav1 y Cav2 es diferente a la de Cav3. Mientras que Cav1 y Cav2 se coexpresan en la mayoría de los tejidos donde hay caveolas (151, 152), Cav3 se encuentra exclusivamente en células musculares (170, 181).

### 1.4.2 Propiedades estructurales de caveolina-1

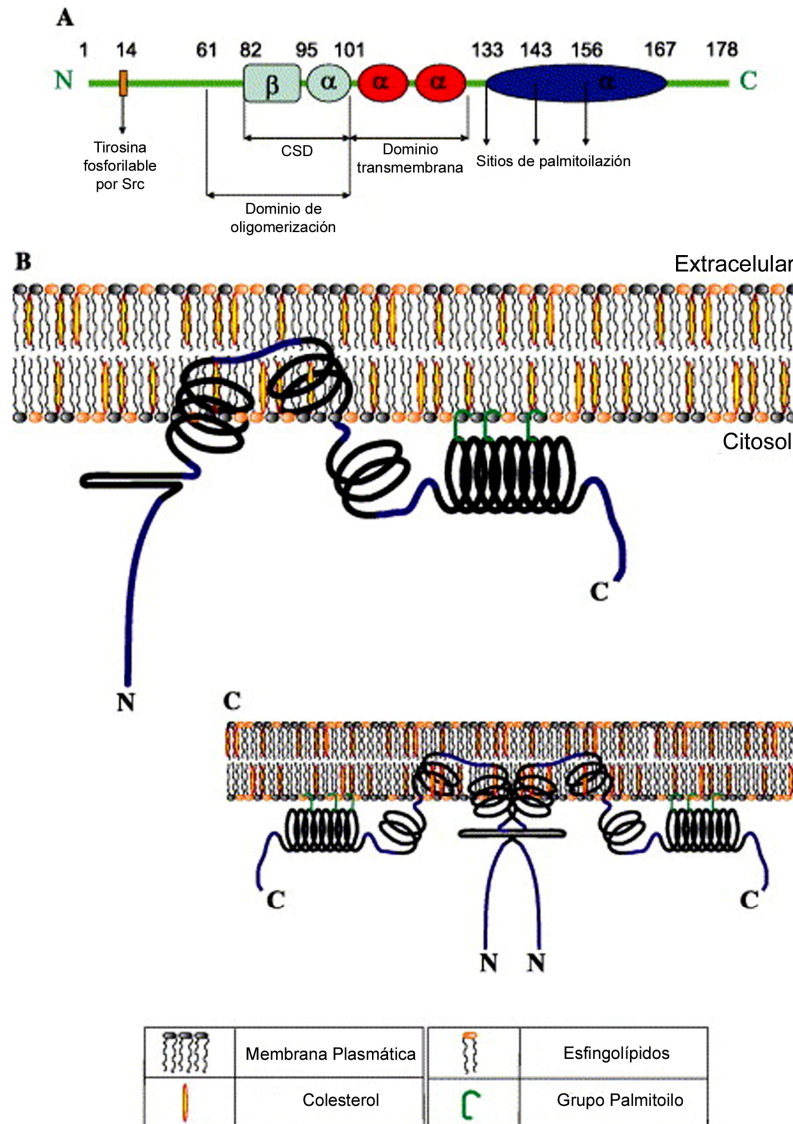
La caveolina es una proteína integral de membrana de unos 22kDa (172). Se ha identificado una región central hidrofóbica en su secuencia (residuos 102-122) por la que se inserta en la membrana plasmática dejando los dominios N-terminal y C-terminal orientados hacia el citoplasma, y por tanto accesibles para la interacción con proteínas citosólicas (39, 103). No obstante, se ha descrito otro dominio denominado “de anclaje” (CSD, *caveolin-scaffolding domain*) que es necesario y suficiente para la localización de caveolina en membrana (Figura 10) (155). Este dominio, comprendido entre los residuos 82 y 101, parece implicado también en la inhibición de proteínas de señalización que interaccionan con caveolina, como la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y en la unión con moléculas de colesterol (172).

En la zona C-terminal próxima a la región transmembrana se encuentran 3 cisteínas palmitoiladas (residuos 133, 143 y 156 en Cav1), que contribuyen a la unión de caveolina al colesterol y a su asociación con la membrana plasmática (185). No obstante, la palmitoilación no es necesaria para la localización de Cav1 en membrana, aunque sí ejerce un importante papel estabilizando su estructura proteica (37, 102).

También se han descrito sitios de fosforilación en el dominio N-terminal (tirosina-14, serina-80) (84, 154). La fosforilación en S80 está implicada en la unión caveolina a la membrana del retículo endoplásmico y a la regulación de su entrada en la vía secretora (154). Por su parte, la fosforilación en Y14 tiene un papel crucial en cuanto a la función reguladora de caveolina en diversas vías de señalización (14, 77, 84).

La Cav1 presenta un dominio de oligomerización por medio del cual se organiza en homo-oligómeros de aproximadamente 200-400 kDa formados por unos 14-16 monómeros. Esta oligomerización comienza ya en el retículo endoplásmico. Y una vez que pasan al aparato de Golgi, estos oligómeros a su vez pueden interaccionar por sus regiones C-terminales para dar lugar a complejos aún mayores. Se genera así una red proteica entrelazada que recubre y da forma a las caveolas (103, 172).

Se han descrito también que Cav1 y Cav2 pueden asociarse para formar hetero-oligómeros de alto peso molecular (151). Sin embargo, Cav2 es incapaz de generar estos complejos en ausencia de Cav1. Asimismo, depende de Cav1 para su transporte a la membrana plasmática, puesto que si no se coexpresa con Cav1, Cav2 queda retenida en el aparato de Golgi en forma de monómero o dímero (104, 123). Cav3 puede formar también grandes complejos oligoméricos de aproximadamente 350-400 kDa. Sus propiedades estructurales son similares a las de Cav1, sin embargo, así como Cav1 interacciona con Cav2, Cav3 no forma complejos con Cav2 (27).



**Figura 10. Estructura de la caveolina-1.** (a) Dominios funcionales y estructurales identificados en Cav1. Modelos propuestos para la topología de Cav1 en la membrana (b) y su oligomerización (c) (representado como homodímero para facilitar su visualización). Figura adaptada de Spisni *et al.*, Biochem Biophys Res Commun.2005.

### 1.4.3 Propiedades funcionales de caveolina-1

Las caveolinas no son solamente proteínas estructurales que forman las caveolas, sino que además tienen un papel activo en la modulación de la actividad de proteínas de transducción de señales. Se ha descrito que las caveolas pueden servir como plataforma para la compartimentalización y concentración de otras moléculas de señalización (115, 161). Con la ayuda de la proteómica se han identificado numerosas proteínas que se localizan preferentemente en caveolas, como receptores tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G, canales iónicos, y diversas proteínas adaptadoras y estructurales. Cav1 estaría actuando en estas plataformas de señalización como proteína adaptadora, interaccionando con otras proteínas a través de su región CSD, regulando su localización subcelular y su actividad. Entre las

proteínas que se asocian a Cav1 mejor descritas se encuentran H-Ras, la familia de tirosinas quinasas Src, la subunidad  $\alpha$  de proteínas G heterotriméricas, y la eNOS. Todas tienen una o varias modificaciones lipídicas (miristoilaciones, palmitoilaciones o prenilaciones) (44, 50, 82, 83, 169). En muchas ocasiones, la interacción con el CSD conduce directamente a la inhibición de la señalización como ocurre con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (25), con Src (82) y con eNOS (137, 161).

A parte de esta importante función reguladora en la transducción de señales, las caveolas intervienen en múltiples procesos celulares como son el transporte de vesículas independiente de clatrina (transcitosis, endocitosis y pinocitosis) (137, 157) y la homeostasis del colesterol (45, 137, 167). Por otro lado, la caveolina se ha descrito que funciona como un regulador negativo de la transformación celular en muchos tipos de tumores, actuando como inhibidor de la proliferación celular, entre otros mecanismos. Aunque también se ha observado que puede actuar como promotor tumoral, como en el caso del carcinoma de próstata y el de las “células no-pequeñas de pulmón” (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) (177). Esto indicaría que los efectos de Cav1 en proliferación celular pueden ser específicos de tejido. Asimismo, hay evidencias sobre un posible cambio en la expresión génica de Cav1 dependiendo del estado de progresión del tumor (134). Por ejemplo, en modelos murinos de cáncer de próstata, se detecta un aumento de expresión de Cav1 en líneas celulares derivadas de metástasis comparado con las células procedentes de tumores primarios (194).

### 1.4.4 Implicación de caveolina en la motilidad celular

Caveolina puede estar afectando a la migración de las células a través de múltiples vías de señalización. Las caveolas y Cav1 concentran y regulan diferentes proteínas que tienen un papel en adhesión, migración e invasión celular, entre ellas la eNOS, algunas GTPasas de la familia Rho, diversos receptores de factores de crecimiento (como los receptores de EGF, VEGF y PDGF) (58, 109), diversas moléculas reguladoras de la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  (como la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (69) y algunas metaloproteasas, como MMP-2 (130) y MT1-MMP (49).

Otro hecho que apoya la implicación de Cav1 en procesos migratorios es que ésta pueda asociarse a través de filamina a las fibras de estrés (174). Se cree que la filamina desempeña un importante papel en la locomoción celular actuando como vínculo entre el citoesqueleto de actina y ciertas proteínas transmembrana, como las integrinas y el complejo de glicoproteína I (98, 127, 160). Además hay evidencias de que Cav1 pueda unirse directamente a diversos tipos de integrinas (49, 190, 192). Por ejemplo, el estrés celular por fuerzas de cizallamiento induce la formación de un complejo de señalización constituido por la integrina  $\beta 1$ , Cav1 fosforilada en Y14 (pY14-Cav1) y la quinasa del extremo carboxilo de Src (CSK) (131). La caveolina también puede unirse a filamentos intermedios de vimentina en células endoteliales. Aunque el papel de

estas estructuras no ha sido estudiado con tanto detalle como el citoesqueleto de actina, se piensa que también tienen una función importante en migración celular (149).

Por otro lado, Cav1 y las caveolas presentan una distribución polarizada dentro de las células en migración. Se ha propuesto que tanto las caveolas como Cav1 se concentran en el polo posterior de la célula cuando ésta se encuentra migrando sobre una matriz bidimensional. Sin embargo, cuando se da una transmigración a través de un poro, se detecta una relocalización de Cav1 hacia el frente de avance dependiente de fosforilación en Y14, de manera que la topografía de la matriz puede estar afectando a su distribución intracelular (122). Beardsley y colaboradores proponen un mecanismo por el que la mayor parte de esta proteína estaría concentrada en el polo posterior impidiendo la protrusión celular en esa región, mientras que habría una subpoblación de Cav1 fosforilada en Y14 que se localizaría en el frente de avance, donde estaría regulando la dinámica de las adhesiones focales (5). Se ha identificado una secuencia relacionada con la distribución polarizada de Cav1 dentro de la célula. Mutaciones en dicha región llevan a la pérdida de la polaridad intracelular de esta proteína así como a una alteración en la capacidad migratoria de la célula (176).

Cav1 fue identificada inicialmente como sustrato de la quinasa Src, que la fosforila en Y14. Esta fosforilación puede darse en respuesta a diversos estímulos, como EGF o insulina; sin embargo, no está claro su significado funcional. Se ha propuesto que esta fosforilación puede servir como sitio de anclaje de proteínas con dominios SH2/PTB, como Grb7, para activar cascadas de señalización (80). Otros trabajos han descrito que la internalización de las caveolas mediada por integrinas está regulada pY14-Cav1, y que dicha internalización podría estar silenciando diferentes vías de señales iniciadas por proteínas como Rac, ERK y PI3K (32).

#### **1.4.5 Controversia en el papel regulador de Cav1 en migración**

Son muchos los trabajos que muestran que la migración se ve afectada por cambios en los niveles de expresión de Cav1. Sin embargo, hay cierta controversia en cuanto al efecto regulador de Cav1 sobre la motilidad celular. Hay muchos datos que sugieren que Cav1 promueve la migración. Por ejemplo, se ha observado que la inhibición de la expresión de Cav1 inhibe la migración endotelial y la capacidad angiogénica de estas células como resultado de la desregulación de la endocitosis de MT1-MMP (49). La supresión de la expresión de Cav1 también se correlaciona con una disminución de la quimiotaxis en astrocitos y células de mieloma múltiple (49, 51, 128). Asimismo, Beardsley y colaboradores mostraron que la transfección de células endoteliales primarias con RNAi de Cav1 llevaba a una alteración en la polarización celular y a una pérdida de direccionalidad en el movimiento de la célula (5). No obstante, hay otros estudios que indican que Cav1 podría estar regulando negativamente la migración. Por ejemplo, la recuperación de la expresión de Cav1 en células MTLn3 reduce la formación de lamelipodios y la respuesta quimiotáctica (203). Asimismo, la inhibición de Cav1

incrementa la migración dirigida hacia esfingosina-1-fosfato en células endoteliales de aorta bovina (56).

Algunas de estas discrepancias podrían deberse a cuestiones técnicas o de especificidad de tipo celular. Por ejemplo, se ha mencionado que Cav1 reduce la quimiotaxis de las células MTLn3, concretamente la estimulada por EGF. Sin embargo, la caveolina puede interaccionar directamente con el receptor de EGF e inhibir su autofosforilación, lo cual bloquea la transducción de señales tras estimulación con EGF (25). Por tanto, la capacidad de respuesta a EGF podría estar reducida en las células MTLn3 transfectadas con Cav1. No queda demostrado que el proceso migratorio en sí esté afectado en este sistema.

En cualquier caso, sería importante determinar qué papel juega Cav1 en la regulación de la motilidad celular.

### **1.4.6 Modelos animales en el estudio funcional de la caveolina.**

El desarrollo de modelos murinos deficientes en caveolina ha permitido analizar la relevancia fisiológica de la caveolina y las caveolas en mamíferos a nivel celular y sistémico (38, 48, 135, 136). La primera caracterización de ratones deficientes en Cav1 fue llevada a cabo simultáneamente por dos grupos en el año 2001 (38, 135). A pesar de que las caveolas participan en numerosas funciones descritas anteriormente, sorprendentemente los distintos modelos murinos generados son viables y fértiles. Sin embargo, un análisis funcional e histológico detallado puso de manifiesto una serie de anormalidades interesantes (137). Por citar un ejemplo, los ratones deficientes en Cav1 presentan una disfunción vascular y alteraciones en los pulmones, entre ellas fibrosis y un engrosamiento del septo alveolar, ésta última causada por la proliferación descontrolada de las células endoteliales (38). Además estos animales son más susceptibles a desarrollar tumores ante tratamientos carcinogénicos (15, 193). Se han generado ratones deficientes en Cav1, Cav2 y Cav3 (38, 48, 135, 136). La pérdida de Cav1 y Cav3, pero no la de Cav2, produce la pérdida de las estructuras caveolares en los tejidos que expresan estas proteínas. Por tanto, los ratones deficientes en Cav1 y Cav3 suponen una buena herramienta para el estudio de estas vesículas *in vivo* (137).

## **2 OBJETIVOS**





1. Estudiar el papel de caveolina-1 en la regulación de los distintos componentes de la maquinaria de polarización celular.
2. Determinar el papel regulador de caveolina-1 en procesos de migración celular direccional, así como explorar la posibilidad de que los datos que se obtengan *in vitro* tengan alguna correspondencia *in vivo*.
3. Establecer los mecanismos moleculares por los que caveolina-1 puede estar afectando la migración y polarización celular.
4. Estudiar el papel de caveolina-1 en la regulación de la adhesión a la matriz extracelular mediada por integrinas.



### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**



### Anticuerpos y reactivos.

La faloidina y la aglutinina de germen de trigo (WGA, *wheat germ agglutinin*), ambas marcadas con tetra-metil-rodamina isotiocianato (TRITC), fueron adquiridas en Molecular Probes Inc. Los anticuerpos conjugados con los fluoróforos Alexa 488, Alexa 594 e isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*), así como los conjugados con peroxidasa fueron obtenidos de Jackson Immuno-Research Laboratories. Los inhibidores de Src (SU6656 y PP2), así como el reactivo PP3 se compraron a Calbiochem (San Diego, CA). La vitronectina, la poli-L-lisina, la subunidad B de la toxina colérica (CTxB) conjugada con FITC y el compuesto Hoechst 33342 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La fibronectina fue purificada a partir de plasma humano según se ha descrito previamente (31).

Los anticuerpos primarios que se han utilizado en este trabajo se muestran en la siguiente tabla:

| ANTICUERPO   | PROCEDENCIA                               |
|--|---|
| Policlonal anti-caveolina  | BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) |
| Monoclonal anti-p190RhoGAP   | BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) |
| Policlonal anti-Cdc42  | Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) |
| Monoclonal anti-RhoA   | Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) |
| Monoclonal anti-Rac1   | Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)   |
| Monoclonal anti-Src  | Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)   |
| Policlonal anti-fosfo-Src(pY418)   | Biosource Internacional Inc. (CA)         |
| Monoclonal anti-fosfo-tirosina (4G10)  | Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)   |
| Monoclonal anti-vinculina  | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)             |
| Monoclonal anti-paxilina   | Invitrogen, Zymed <sup>®</sup>            |
| Policlonal anti-pericentrina   | Covance (Denver, PA)                      |
| Monoclonal anti-tubulina   | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)             |
| Monoclonal anti-talina   | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)             |
| Monoclonal anti-integrina $\beta$ 1 (KMI6)                                     | BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) |
| Monoclonal anti-integrina $\beta$ 1 (9EG7) (específico de conformación activa) | BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) |
| Monoclonal anti-integrina $\beta$ 3  | BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) |
| Monoclonal anti-Flag M2  | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)             |

### **Mantenimiento de los ratones.**

Ratones Cav1<sup>-/-</sup>, de la cepa Cav1<sup>tm1Mls/J</sup> y sus correspondientes controles Cav1<sup>+/+</sup> fueron obtenidos de Jackson Laboratoires (Bar Harbor, ME, USA). Estos animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (2018 Teklad global, Harlan Interfauna Ibérica S.L. Barcelona) y se mantuvieron con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (con encendido de la luz a las 08:00 a.m.). El mantenimiento de los animales se realizó siguiendo la normativa internacional. Se realizaron periódicamente informes de seguimiento sanitario, en los que consta la ausencia de todo organismo patógeno, de acuerdo a las recomendaciones de FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

### **Cultivos celulares.**

En este trabajo se han utilizado fibroblastos de embrión de ratón (MEFs) (135) y fibroblastos de timo (186) procedentes de ratones Cav1<sup>-/-</sup> y de sus controles Cav1<sup>+/+</sup>, cedidos por los doctores M.P. Lisanti y R.G.W. Anderson respectivamente. Todos los experimentos realizados en fibroblastos se llevaron a cabo con ambas líneas celulares, en paralelo, excepto los ensayos de polarización del MTOC, la determinación de la actividad GTPasa y los ensayos de reciclaje de las estructuras de adhesión, que se realizaron únicamente en MEFs. Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). En las mismas condiciones fueron crecidas las células epiteliales HeLa y la línea de melanoma M21L. Las células M21L que expresan de forma estable pCDNA3-Cav1-Myc fueron cultivadas con gentamicina (Gibco, Gaithersburg, MD) como antibiótico de selección. Se utilizaron también células endoteliales (MLECs) extraídas del pulmón de ratones Cav1<sup>-/-</sup> y de sus controles Cav1<sup>+/+</sup>, cedidas por el Dr W.C. Sessa. Estas líneas se cultivaron en DMEM-F12 suplementado con 20% FBS, L-glutamina, factores de crecimiento, heparina (100 µg/ml), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml).

### **Plásmidos y construcciones de RNAi.**

El plásmido GFP-p190 R1283A, previamente descrito (112), fue cedido por el Dr. Burridge (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC). Las construcciones que codifican para Rac T17N (dominante negativo), Rac G12V (mutante constitutivamente activo), Cdc42 T17N (dominante negativo) y Rho G14V (mutante constitutivamente activo), todas ellas clonadas en el vector pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU), han sido descritas

previamente (33). El ADN que codifica para la caveolina-1 murina marcada con el péptido Flag en su extremo carboxi-terminal, originalmente clonado en el vector pcDNA3, fue cortado con BamH1-EcoRI y posteriormente subclonado en el vector retroviral MIGR1, que incluye GFP en una unidad bicistrónica (124). A su vez, el plásmido Flag-Cav1 Y14F fue cortado con BglII-BamH1 y subclonado también en el vector retroviral MIGR1. El RNAi específico de Cav1 humana fue obtenido de Dharmacon, y el RNAi específico de talina humana fue cedido por el Dr. Teixidó.

### **Generación de líneas celulares estables por infección retroviral.**

Las líneas celulares NIH-3T3 y 293T/17 fueron transfectadas con los vectores MIGR1, MIGR1-Cav1, o MIGR1-Cav1 Y14F, junto con el plásmido empaquetador pSV $\psi$ 2. Para ello se utilizó Lipofectamina2000 (Invitrogen), o bien el método de transfección por fosfato cálcico. Tras 48 horas, los sobrenadantes cargados de partículas retrovirales son filtrados y añadidos a los cultivos de fibroblastos deficientes en caveolina-1, en presencia de suero (10%FBS) y del polímero catiónico Polybrene (4 $\mu$ m/ml). Después de otras 48 horas, las células que expresan GFP fueron detectadas y aisladas utilizando un separador de células MoFlo (DAKO-Cytomation). Se comprobó por *western blot* que los niveles de expresión de Cav1 y Cav1 Y14F en estas líneas celulares estables eran muy similares a los niveles de la caveolina-1 endógena.

### **Supresión de la expresión de p190RhoGAP mediante ARN de interferencia.**

La secuencia diana de p190RhoGAP de ratón (nucleótidos 2935–2953, 5'-gttatggacgcaacattaa-3') y la secuencia control (5'-gcgcgcttttaggattcg-3') fueron clonadas en el vector de ARNhc (ARN horquillado corto) pSuperRetroNeo+GFP (Oligoengine) con el fin de generar los vectores pSuperRetroGFP-p190-2935 y pSuperRetroGFP-Control, respectivamente. Cada uno de estos dos vectores fueron cotransfectados con el plásmido empaquetador pSV $\psi$ 2 en células 293T/17, utilizando el reactivo de transfección Eugene 6 (144). Los fibroblastos deficientes en caveolina-1 fueron infectados con los sobrenadantes retrovirales resultantes, como se ha indicado previamente, y se aislaron las células con alta expresión de GFP por medio del separador celular MoFlo.

### **Ensayos de inmunofluorescencia.**

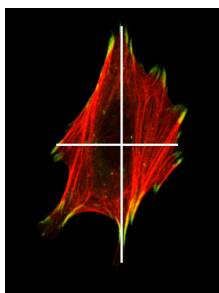
Las células se cultivaron en placas multipocillo de 24, sobre cristales tapizados con 5  $\mu$ g/ml de FN y se incubaron a 37°C durante los distintos tiempos de adhesión. A continuación se fijaron en formaldehído al 2% en PBS durante 20 minutos, se permeabilizaron con 0,2% Triton X-100 en PBS durante 10 minutos, y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 3% (BSA), o bien con suero de cabra al 10%. Para marcar las adhesiones focales, las preparaciones

fueron incubadas con anticuerpos primarios anti-vinculina y anti-paxilina, y con los correspondientes anticuerpos secundarios anti-IgG conjugados con FITC o con Alexa 594. El citoesqueleto de actina fue teñido con faloidina- TRITC. Los cristales fueron fijados a portas con Mowiol.

Para el caso de las tinciones de células en suspensión, tras su tripsinización las células fueron mantenidas en suspensión durante 2 horas a 37 ° C, y previa a la fijación, se realizó el marcaje de GM1 incubando las células a 4 ° C durante 30 min con CTxB-FITC. Las células suspendidas fueron después fijadas a cristales tapizados con poli-L-lisina.

Dependiendo del ensayo, las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal (Radiance 2100; Bio-Rad Laboratories, Inc.), o bien con un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 200 M SP LSM5; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) equipado con una cámara CCD CoolSnap fx (Photometrics).

Para la determinación del factor de elongación celular, las membranas plasmáticas de células fijadas y sin permeabilizar fueron teñidas con WGA-TRITC (10 µg/ml). Las imágenes adquiridas a partir de estas preparaciones se analizaron con el *software* informático MetaMorph (Universal Imaging Corp.). El contorno de cada célula (resaltado por la tinción de membrana) fue delimitado por medio de un algoritmo de detección de borde, y utilizando la función del MetaMorph “integrated morphometry analysis” se calculó un parámetro denominado “factor elíptico” (EF, elliptical factor), definido como el cociente entre el eje más largo y el eje más corto en la célula, y utilizado como medida de la elongación celular (Figura 11).



**Figura 11. Factor elíptico.** La morfología de las células fue cuantificada con un parámetro denominado “factor elíptico”, definido como el cociente entre el eje más largo y el eje más corto en la célula.

### Citometría de flujo

Para el análisis de la expresión de integrinas en superficie, se despegan las células de la placa utilizando un buffer disociante no enzimático (Gibco-Invitrogen) y se lavan dos veces con PBS 0,1% FBS. Tras incubación con el primer anticuerpo (anti-β1 o anti-β3) diluido en el medio de lavado durante 1 h a 4° C, se lavan las células como anteriormente y se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con Alexa 488 (1h a 4° C). Se vuelven a lavar y finalmente se resuspenden las células en 400 µl para su posterior análisis en un citómetro de flujo (FACS-Canto, Becton Dickinson).



**Ensayos de quimiotaxis en cámaras Transwell.**

Se utilizaron cámaras Transwell con membrana de policarbonato con tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  (Corning Costar Corp.). Las membranas fueron tapizadas con 5  $\mu\text{g/ml}$  de FN. Las células fueron privadas de suero durante las 24 horas previas al experimento. Después de tripsinizar las células, éstas se resuspenden y diluyen en DMEM 0,2% BSA en presencia de inhibidor de tripsina de soja, y se añaden a la parte superior del filtro de las cámaras (15.000 fibroblastos por Transwell). Los compartimentos inferiores fueron llenados con 500  $\mu\text{l}$  de DMEM 10% FBS, excepto los controles negativos que contienen DMEM 0,2% BSA. Las cámaras fueron incubadas a 37°C durante 4 horas para permitir la migración celular. Pasado ese tiempo, las membranas son lavadas con PBS, fijadas con 2% formaldehído en PBS durante 20 minutos y teñidas con Hoechst 33342 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 30 minutos a temperatura ambiente para marcar los núcleos de las células. Los fibroblastos que no han migrado son retirados de la superficie superior del filtro con la ayuda de bastoncillos de algodón. Mientras que las células que han migrado a la parte inferior de la membrana son contadas con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Axiovert 200 M SP LSM5; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). Se analizaron 5 campos escogidos aleatoriamente de cada Transwell. Los resultados se expresaron como el número medio de células migradas por campo, restando previamente la migración inespecífica registrada en los controles negativos.

**Ensayos de adhesión celular**

Se tapizaron placas de 96 pocillos con 5  $\mu\text{g/ml}$  de FN o de vitronectina. Como control negativo de adhesión de cubrieron pocillos con PBS 1% BSA desnaturalizada previamente, y esta misma fue usada para bloquear las matrices de FN y vitronectina. La adhesión de las células se llevó a cabo durante 45 minutos a 37 ° C. Después los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS, y las células adheridas fueron fijadas con PBS 2% formaldehído durante 15 min, permeabilizadas en PBS 20% metanol durante 5 min, y se tiñen en PBS 0,5% Cristal Violeta 20% Metanol durante 10 min. El colorante se eluye de las células con una solución 1:1 de etanol/citrato sódico 0,1M pH 4,2, y se cuantifica midiendo la absorbancia a 595 nm en un lector de placa (BioRad lab. Inc.). Para los ensayos de inhibición de Src, se trataron las células Cav1<sup>-/-</sup> con SU6656 (1 $\mu\text{M}$ ) o PP2 (5 $\mu\text{M}$ ) durante los últimos 15 y 30 minutos del periodo de adhesión, respectivamente. Se utilizaron DMSO y PP3 como controles negativos del tratamiento.

### **Ensayos de reciclaje de estructuras de adhesión**

Para marcar las adhesiones focales, los fibroblastos fueron transfectados de forma transitoria con paxilina-GFP. Tras 48 horas, las células fueron añadidas a una placa de 8 pocillos con fondo de cristal (LabTek), cubierta previamente con 5  $\mu\text{g/ml}$  de FN. Después de 45 minutos de adhesión, se llenan los pocillos con Optimem (Invitrogen) suplementado con 10% FBS y 5mM HEPES, y se transfiere la placa al microscopio. Para el seguimiento de la dinámica de adhesiones focales, se adquirieron imágenes de las muestras durante 2 horas y media a intervalos de 2,5 minutos, utilizando el objetivo 60 $\times$  1.4 NA Plan Apo de un microscopio invertido (Eclipse TE300; Nikon) equipado con una cámara incubadora Nevtek, manteniendo la temperatura a 37°C. El microscopio dispone asimismo de un sistema con una pletina robotizada que permite el rastreo de múltiples posiciones en un mismo experimento. Las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD (Orca II; Hamamatsu). El tiempo de formación y desaparición de las estructuras de adhesión fue cuantificado por dos investigadores de manera independiente y empleando el “método de doble ciego”. Sólo se analizaron las adhesiones de nueva formación en las áreas en protrusión de la célula. A partir de estos tiempos de aparición/desaparición se determinó la vida media de las adhesiones en los distintos tipos celulares (Videos 1,2).

### **Ensayos de videomicroscopía en contraste de fases.**

Para analizar la migración celular en ausencia de estímulos quimiotácticos, se pusieron los fibroblastos sobre una matriz de FN (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y en ausencia de FBS, y se adquirieron imágenes de las células en contraste de fases cada 8 minutos durante un periodo de 10 horas. El sistema de videomicroscopía fue similar al empleado para el análisis de adhesiones. En este caso el objetivo usado fue 20 $\times$  0.5 NA Plan (Videos 5-7). Para determinar las trayectorias recorridas por las células durante esas 10 horas, se hizo un rastreo de los centroides de las células con la ayuda de un complejo programa informático escrito en Matlab (desarrollado y proporcionado por los Doctores Johan de Rooij y Gaudenz Danuser), que permitió la automatización del análisis. La fidelidad de la detección celular por este programa fue superior al 90% generalmente, y fue comprobada en todos los casos visualizando las secuencias de imágenes con las trayectorias. Como control adicional, se rastreó un menor número de células en varios videos utilizando el módulo “track object” del Metamorph, obteniéndose el mismo resultado.

**Ensayos de protrusión y retracción.**

Las imágenes de videomicroscopía de paxilina-GFP fueron usadas también para el análisis de la protrusión celular. Para ello, se delimitó el contorno celular con el umbral de intensidad de píxeles en las imágenes de fluorescencia. Se fue restando cada fotograma del anterior en cada una de las secuencia de imágenes, y se asignó el color blanco al área en protrusión, el color negro al área en retracción, y el color gris al área que prevalece. Los nuevos fotogramas generados a partir de este código de colores fueron compilados con Metamorph, y a partir de estos nuevos videos se calculó el porcentaje del área total de la célula que se encuentra en protrusión/retracción en lapsos de tiempo de 2,5 minutos (intervalo de tiempo entre 2 imágenes consecutivas) (Videos 3,4).

**Ensayos de cierre de herida in vitro y cuantificación de la polarización celular.**

Los fibroblastos se crecieron hasta confluencia en placas con fondo de cristal y fueron privadas de suero 24 horas antes de llevarse a cabo el ensayo. Las incisiones se realizaron con una punta de pipeta de 1 mm de grosor aproximadamente. El cierre de herida se monitorizó por videomicroscopía, tomando imágenes en campo claro en intervalos de 45 minutos durante un periodo final de 48 horas (Videos 8-10). El área migrada fue calculada restando el área entre los bordes de la incisión a los distintos tiempos del área inicial medida a tiempo 0.

Para el ensayo de polarización del MTOC, las células fueron crecidas hasta confluencia sobre cubreobjetos de cristal, y las monocapas se fijaron a 2, 4, 6 y 8 horas tras realizar la incisión sobre las mismas. Tras previa permeabilización, los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342, la actina con faloidina-TRITC, y el MTOC fue marcado con anticuerpos anti-pericentrina y un secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa488. Los cristales fueron fijados a portas con Mowiol, y se adquirieron imágenes de las heridas con un microscopio de fluorescencia (Axiovert 200 M SP LSM5; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). Como medida de polarización, se cuantificó el porcentaje de células con MTOC orientado hacia la herida, teniéndose en cuenta exclusivamente la primera línea de células del borde de la incisión.

**Ensayos de cicatrización de herida in vivo.**

Los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con Ketamina/Xilacina (0.5ml de xilacina + 1.5ml ketamina + 8ml de suero, inyectándose en los ratones en la dosis (PV (g)/100)+0.1ml ml). El pelo de la parte dorsal donde se practica la escisión se rasuró y la zona de trabajo se limpió con etanol para proceder en condiciones asépticas. En cada ratón se realizaron 2 heridas circulares por escisión de dermis y epidermis en la línea media de la parte dorsal de 3,5 mm de diámetro aproximadamente. Las heridas se monitorizaron diariamente mediante la adquisición de fotografías con una cámara digital

(DFC490; Leica), midiendo el diámetro de las mismas a los distintos tiempos, y determinando su área con el programa de análisis de imagen Leica IM50 Image Manager. El grado de cicatrización fue representado como porcentaje del área inicial de la herida a lo largo de los días.

### **Ensayos de *western blot*.**

Para el análisis de proteínas por *western blot*, cantidades iguales de proteína (10-30 µg) de cada lisado se desnaturalizaron a 95° C en tampón Laemmli, se cargaron en geles de poliacrilamida (con porcentaje de acrilamida en función del peso molecular de la proteína en cuestión) en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) y se fraccionaron electroforéticamente. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C; Amersham Pharmacia Biotech, UK). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en una solución de leche en polvo desnatada al 5% en TBS 0,1% Tween-20, excepto para detectar proteína fosforilada, en cuyo caso el bloqueo se realizó con 3% BSA en TBS-Tween. A continuación, las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos específicos correspondientes disueltos en solución de bloqueo. Después de lavar las membranas con TBS-Tween, fueron finalmente incubadas durante 40 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Las proteínas se visualizaron utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL siguiendo el protocolo de Amersham. El análisis densitométrico se realizó usando el *software* Science Lab 2001 Image Gauge V4.0 (Fuji Photo Film, CO., LTD). Las unidades expresadas son arbitrarias.

### **Ensayos de fraccionamiento celular**

Las células son lavadas primero con PBS y después con una solución de lavado que contiene 10 mM Hepes pH 7,5 y 140 mM NaCl. A continuación son lisadas en un buffer que contiene 10mM Hepes pH 7,5, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM KCl, 1mM DTT, e inhibidores de fosfatasas y de proteasas. Los lisados son pasados por un homogeneizador, y son centrifugados a 2.000 rpm durante 10 min. Se recuperan los sobrenadantes y se vuelven a centrifugar, esta vez a 15.000 G durante 30 min. Estos nuevos sobrenadantes contienen la fracción soluble o citoplasmática de la muestra. En cuanto a los precipitados o pellets, se hace un lavado rápido con buffer de lisis RIPA, y después se incuban con este mismo buffer 20 min a 4° C con el fin de solubilizar las membranas. Se centrifugan 10 min a la máxima velocidad, y se recogen los sobrenadantes que contendrán la fracción de membrana de la muestra. Tras un ensayo de proteína para determinar la concentración proteica de cada fracción, las muestras se resuelven por *western blot*.

### **Análisis de la fosforilación de 190RhoGAP por inmunoprecipitación**

Las células se lisaron en 500 µg de solución de lisis RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 1% Tritón X-100, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA y 3 mM EGTA) en presencia de diversos inhibidores de fosfatasas (10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 30 mM NaF y 3 mM  $\beta$ -glicerofosfato) y de inhibidores de proteasas (1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina y 10 mM PMSF). Los lisados fueron centrifugados a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se usaron 15 µl del sobrenadante para el análisis de la proteína total, y el volumen restante se incubó durante 2 h con un anticuerpo monoclonal anti-p190RhoGAP. Posteriormente se añadieron bolas de proteína G-agarosa (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Los inmunocomplejos se formaron durante 2 horas y después se lavaron 5 veces en PBS. Después del último lavado, las proteínas unidas a las bolas fueron eluidas en solución de Laemmli y sometidas a electroforesis. Las proteínas fosforiladas presentes en el inmunoprecipitado fueron detectadas usando un anticuerpo anti-fosfo-tirosina (4G10).

### **Determinación de la actividad GTPasa.**

La actividad basal de las proteínas de la familia de las RhoGTPasas se cuantificó mediante ensayos de arrastre (*pull-down*), utilizando el dominio de unión a Rho activo de Rhotekina (RBD, *Rhotekin binding domain*) y el dominio de unión a Rac/Cdc42 de la proteína PAK (PBD, *PAK binding domain*), fusionados a la enzima glutatión S-transferasa (GST). Estas construcciones, clonadas en el vector pGEX-2T, se expresaron en *Escherichia coli* BL21 y la proteína se purificó como está descrito (147).

Las células fueron lisadas en 400 µl de solución de lisis (0.5% IGEPAL; 10 mM Tris-HCl pH 7; 10% glicerol; 500 mM NaCl; 1 mM  $\text{MgCl}_2$  y 1 mM EGTA) a 4° C y los lisados fueron clarificados por centrifugación. Se utilizaron 30 µl del sobrenadante para determinar la cantidad total de las GTPasas y el volumen restante se incubó con 20 µg de RBD-GST o PBD-GST y 20 µl de bolitas de glutatión-agarosa durante 30 minutos a 4° C. Las bolitas se lavaron y las proteínas unidas se eluyeron hirviendo en tampón de carga de Laemmli. Las muestras se separaron por SDS-PAGE conteniendo el 13% de acrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Rho, Rac y Cdc42 se detectaron mediante anticuerpos específicos y posterior incubación con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o conejo, según el primario, conjugados con HRP. Las bandas de proteína se visualizaron y cuantificaron como se ha explicado previamente.

### Ensayo de quinasa en gel

Con el fin de testar la actividad quinasa de PAK, las células fueron cultivadas en DMEM 0.2 % FBS durante 24 h. Parte de las células fueron mantenidas en suspensión durante 2 horas, y después lisadas en buffer de lisis (20 mM Tris, pH 7.6, 0.5% NP-40, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM EGTA, 20 mM fosfato sódico, 10 mM piro-fosfato sódico, 3 mM glicero-fosfato, 10 µg/ml leupeptina, 1 mM vanadato sódico, 1 mM PMSF, 1 mM NaF). El resto de las células fueron puestas en adhesión sobre matrices de FN antes de ser lisadas con el mismo buffer.

La proteína PAK fue inmunoprecipitada de los lisados celulares con anticuerpos anti-PAK1 (policlonal R626, (35)). Las muestras se separaron por SDS-PAGE conteniendo el 10% de acrilamida, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que fueron incubadas posteriormente con anti-PAK para revelar la cantidad de proteína inmunoprecipitada. La actividad quinasa de PAK se determinó utilizando un ensayo quinasa en-gel (*in-gel kinase assay*, previamente descrito en (140)). Los inmunoprecipitados fueron resueltos en geles al 10% acrilamida que contienen 0.5 mg/ml de proteína básica de la mielina (MBP). A continuación las proteínas del gel fueron renaturalizadas y se inició la actividad quinasa sobre el sustrato MBP, empapando los geles en un buffer que contiene 25 µCi/ml [<sup>32</sup>P] ATP y 10 µM ATP no marcado. Los geles fueron lavados meticulosamente y autorradiografiados.

### Análisis estadístico.

La significación estadística de todos los datos fue estimada mediante la prueba T de Student, utilizando para este análisis el *software* OriginPro7 (OriginLab Co.). Los resultados fueron considerados significativos con un valor  $p < 0.05$ .

## **4 RESULTADOS**



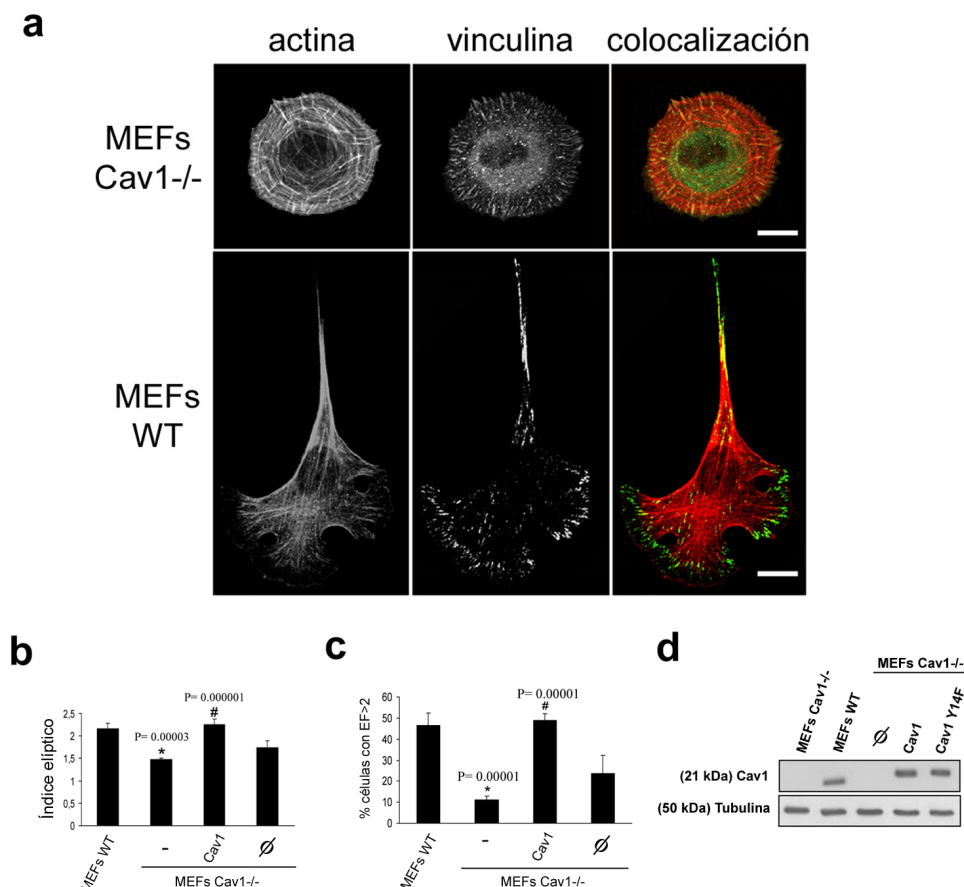


## **4.1 Caveolina-1 es necesaria para la adquisición de un fenotipo polarizado en la célula**

### **4.1.1 La ausencia de Cav1 provoca anomalías en la estructura del citoesqueleto de actina y en el patrón de los complejos de adhesión.**

El objeto de estudio de la presente tesis es caracterizar el papel de caveolina-1 en polarización y migración celular. Para este estudio se trabajó en paralelo con dos líneas diferentes de fibroblastos extraídas de ratones Cav1<sup>-/-</sup> y de sus correspondientes controles con fenotipo salvaje (WT, *wild-type*). Un primer rasgo a destacar en el fenotipo de los fibroblastos deficientes en Cav1 es una morfología alterada. Para caracterizar este hecho, las células WT y Cav1<sup>-/-</sup> se analizaron y compararon por inmunofluorescencia confocal. A tiempos cortos de adhesión sobre FN (2h) podemos apreciar importantes cambios morfológicos (Figura 12 a). La mayoría de los MEFs WT presentaban la típica forma poligonal elongada, con fibras de estrés organizadas en haces longitudinales y conectando adhesiones focales localizadas en distintos polos de la célula. Sin embargo, los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> adoptan en su mayoría una forma celular más redondeada y presentan un citoesqueleto de actina aberrante. Las fibras de estrés se disponen concéntricamente en la periferia, creando anillos de actina. Asimismo se detectaron alteraciones en el patrón de las adhesiones focales teñidas con vinculina. Comparado con los MEFs WT, los fibroblastos deficientes en Cav1 tienen un mayor número de estructuras de adhesión y son generalmente más pequeñas, más parecidas a los llamados complejos focales (53). Además, las adhesiones se distribuyen generalmente por toda la superficie ventral de la célula, mientras que en los MEFs WT estas estructuras se localizan principalmente en las áreas periféricas de la célula y en los extremos de las protrusiones. Asimismo, es interesante destacar la existencia de una tinción homogénea de vinculina por el citoplasma de las MEFs Cav1<sup>-/-</sup>, ausente en las WT, que podría ser indicativo de una mayor cantidad de vinculina no asociada a complejos de adhesión (Figura 12 a). Esto apoyaría el fenotipo de complejos focales inmaduros observado en estas células. El patrón de adhesiones se analizó también con anticuerpos anti-paxilina, obteniéndose el mismo resultado (Figura 28 f; Figura 29 a).

Para cuantificar estas diferencias morfológicas observadas, se calculó un parámetro llamado factor elíptico (EF, *elliptical factor*), definido como el cociente entre el eje más largo y el eje más corto en la célula. En los MEFs WT el EF fue significativamente más alto que en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> (Figura 12 b). Estas diferencias son todavía más evidentes si comparamos el porcentaje de células en las dos poblaciones con EF>2 (indicativo de una morfología polarizada, o al menos, muy elongada), muy superior en las WT (Figura 12 c). Se obtuvieron resultados muy similares con los fibroblastos extraídos del timo de ratones WT y Cav1<sup>-/-</sup> (Figura 28 d,e; Figura 29 a).



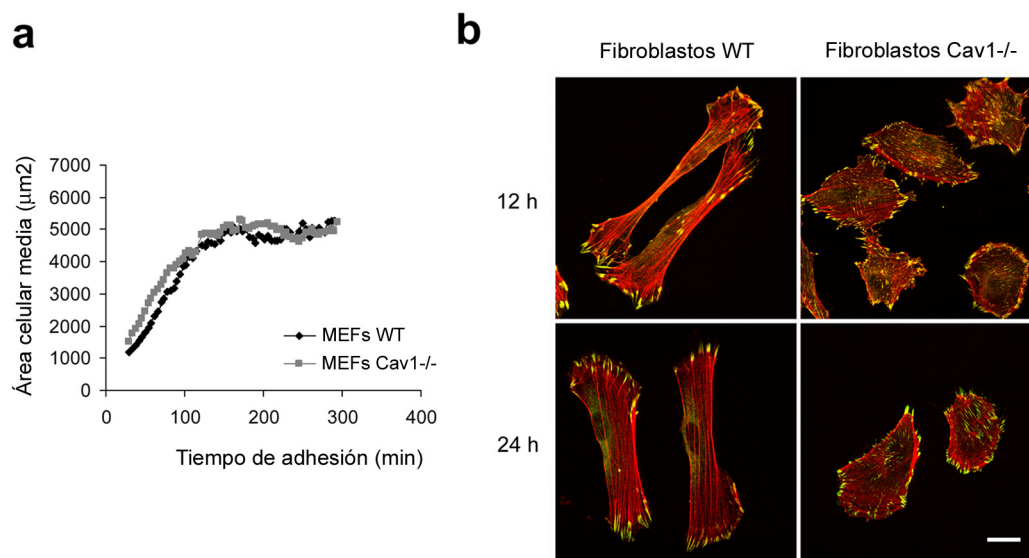
**Figura 12. Los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> presentan alteraciones en la morfología celular, en la disposición de las fibras de estrés y en el patrón de las estructuras de adhesión.** (a) MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron sembrados sobre una matriz de FN (5µg/ml), se fijaron y se tiñeron con faloidina-TRITC para revelar la morfología del citoesqueleto de actina. Los complejos de adhesión fueron marcados con anticuerpos anti-vinculina, seguido de anticuerpos secundarios conjugados con FITC. Barra, 20 µm. (b) El factor elíptico, EF (eje longitudinal/eje transversal), utilizado como medida de la elongación celular, fue calculado en los MEFs WT (n=797), MEFs Cav1<sup>-/-</sup> (n=663), MEFs Cav1<sup>-/-</sup> reconstituidos con Cav1 (n=481) y los controles transfectados con el vector vacío (Ø, n=450), tras 4 horas de adhesión a FN. Las barras de error indican S.E.M. de 5 experimentos independientes. (c) El porcentaje de células con EF mayor de 2 fue calculado para cada línea celular. Las barras de error indican S.E.M. (d) MEFs WT, MEFs Cav1<sup>-/-</sup> y los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> reconstituidos con el vector vacío (Ø), con Cav1 o con Cav1-Y14F fueron lisados y se analizaron los niveles de Cav1 por SDS-PAGE, utilizando tubulina como control de carga. Cav1 exógena está marcada con el péptido “flag”.

El fenotipo observado en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> hace pensar en un posible retraso en la extensión (*spreading*) de la célula sobre el sustrato. Sin embargo, haciendo un seguimiento del área de las células a lo largo del tiempo se vio que no había alteraciones en la extensión de los fibroblastos tras la adhesión celular (Figura 13 a). Este parámetro alcanza su máximo entre las 2 y las 4 horas de adhesión a FN. Por otro lado, se comprobó que las alteraciones del citoesqueleto de actina y del patrón de adhesiones continúan siendo evidentes a tiempos de adhesión más largos, a 12 y 24 horas sobre FN (Figura 13 b).

La re-expresión de Cav1 en las células Cav1<sup>-/-</sup> por infección retroviral provocó una reversión del fenotipo, recuperándose el valor de EF (Figura 12 b,c; Figura 29 a), y confirmándose así su

implicación en el fenotipo observado. En la Figura 12d se puede observar que los niveles de expresión de Cav1 en la línea estable generada son comparables a los de la Cav1 endógena.

Todos estos datos sugieren que la Cav1 es necesaria para la adquisición de un fenotipo elongado en la célula, para una adecuada organización de las fibras de estrés, y para la correcta formación de los complejos de adhesión en los fibroblastos.

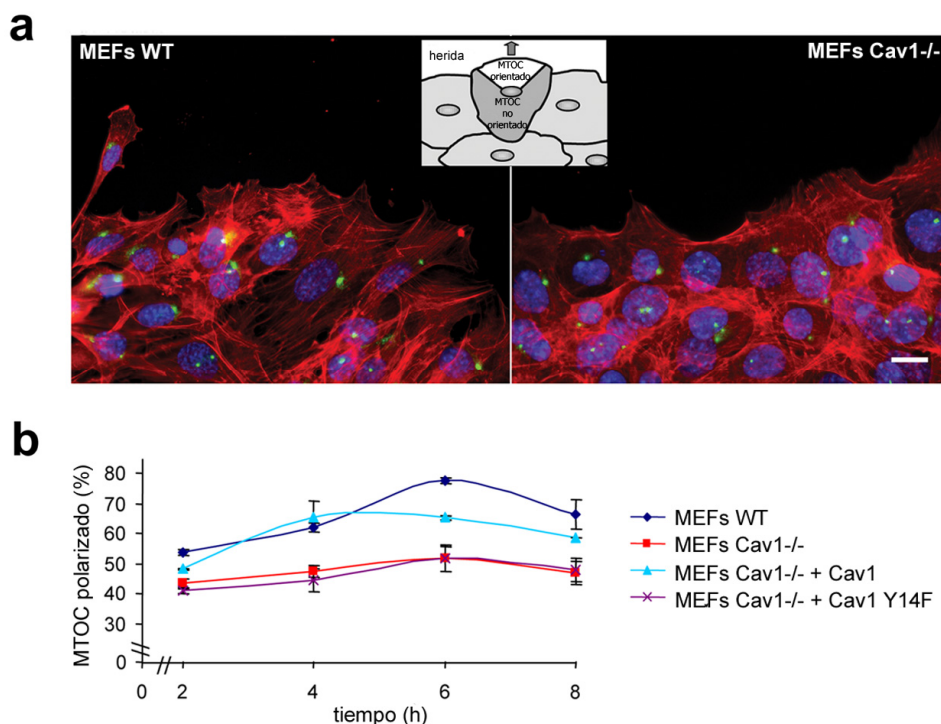


**Figura 13. La ausencia de Cav1 no produce retraso en la extensión celular o *spreading*.** (a) MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron cultivados sobre una matriz de FN (5µg/ml) durante 5 horas y monitorizadas por video-microscopía en contraste de fases durante ese periodo. Se midió el área de las células con ayuda de un *software* escrito en Matlab, empezando el análisis a los 30 minutos de adhesión celular. En cada fotograma se calculó el área total ocupada por las células dividido por el número de células en el campo, para obtener el área media por célula, representada en la gráfica (n = 46-52 células). (b) MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron cultivados sobre FN durante 12 o 24 horas, y a continuación se fijaron y se tiñeron con faloidina-TRITC (rojo) y anticuerpos anti-vinculina (verde). Las imágenes muestran células representativas de cada condición. Barra, 20 µm.

#### 4.1.2 Los fibroblastos deficientes en Cav1 tienen alterada la maquinaria de polarización celular.

La polarización celular se correlaciona normalmente con una morfología celular alargada, pero polarización y elongación no son necesariamente equivalentes. Para medir la polaridad celular de una forma más directa, se llevaron a cabo ensayos más específicos como es la medida de la polarización del MTOC en fibroblastos activados por un estímulo direccional. Se analizaron las células migrando en una monocapa en la que se había practicado una herida, y se comprobó que en la población de MEFs Cav1<sup>-/-</sup> había un menor porcentaje de células con MTOC re-orientado hacia el frente de avance a distintos tiempos de cierre de herida. La re-expresión de Cav1 en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> recuperó los valores de polaridad celular hasta alcanzar los observados en los MEFs WT (Figura 14).

Conjuntamente, estos resultados demuestran una alteración en el establecimiento de la polarización celular en los fibroblastos deficientes en Cav1, y establecen una correlación entre los defectos de elongación y los defectos de polarización en estas células.



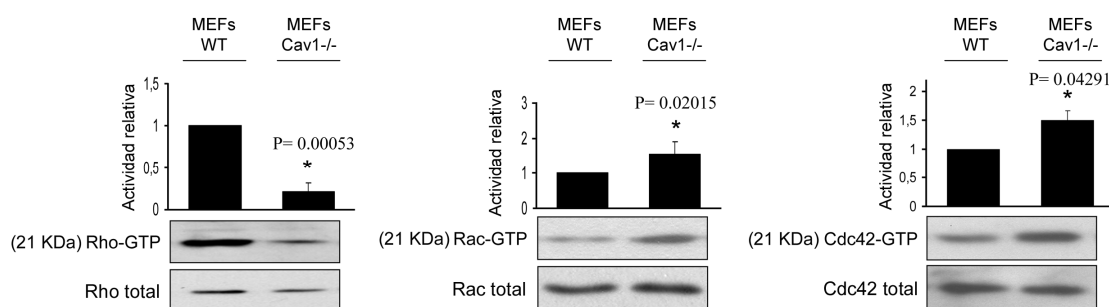
**Figura 14. MEFs Cav1<sup>-/-</sup> presentan un defecto en el establecimiento de la polaridad celular. (a)** Monocapas de fibroblastos fueron fijadas 2, 4, 6 y 8 horas después de haberse realizado una incisión en las mismas. Se tiñeron entonces por inmunofluorescencia los núcleos (azul), la F-actina (rojo) y la pericentrina (verde) que es un marcador del MTOC. Las imágenes muestran bordes de herida representativos de monocapas WT y Cav1<sup>-/-</sup>. El criterio para considerar MTOC como polarizado se explica en el diagrama. Barra, 20  $\mu$ m. **(b)** Se midió el porcentaje de células con MTOC reorientado en los tiempos indicados tras la incisión, considerando sólo las células de la primera línea del borde de la herida. Para cada tiempo se analizaron 150-300 células. Los valores representan las medias  $\pm$  S.E.M. de 3 experimentos independientes.

## 4.2 Caveolina-1 modula la actividad de las RhoGTPasas y afecta a los procesos biológicos en los que intervienen estas GTPasas.

### 4.2.1 Los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> presentan alteraciones en la actividad de las RhoGTPasas

Tanto el fallo en la polaridad celular como los defectos en el patrón de las estructuras de adhesión y las fibras de estrés encontrados en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> sugieren anomalías en la actividad de las GTPasas de la familia Rho, ya que estas proteínas con las principales reguladoras de estos procesos (12, 133, 187). Para contrastar esta hipótesis, se realizaron ensayos de arrastre o *pull-down* con el fin de determinar los niveles de activación de los 3 miembros más importantes de esta familia de GTPasas, Rho, Rac y Cdc42. Se observó una disminución notable en la actividad basal de Rho en las MEFs Cav1<sup>-/-</sup>, así como un incremento

considerable en la actividad de Rac y Cdc42 en dichas células, comparado con los niveles encontrados en las MEFs WT (Figura 15). Estos resultados se correlacionan con las alteraciones descritas en las fibras de estrés y en las adhesiones focales.



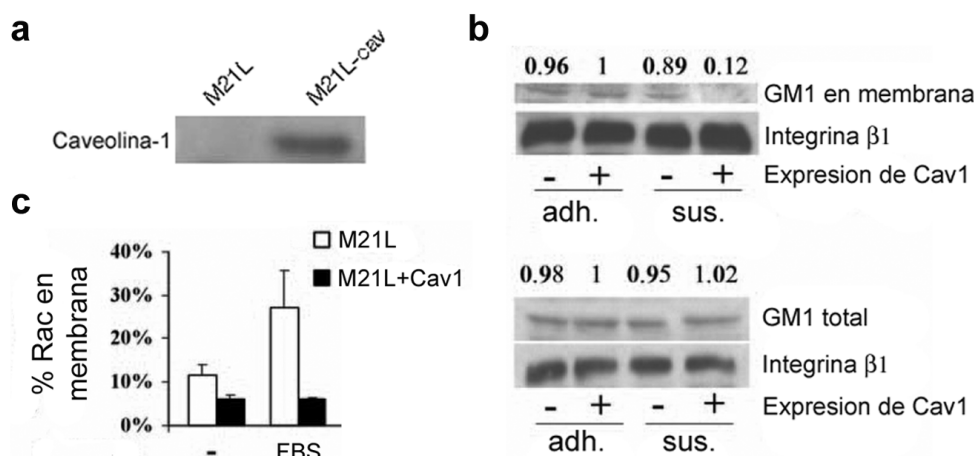
**Figura 15. Los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> muestran alteraciones en la actividad de las Rho GTPases.** MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron lisadas y se llevaron a cabo ensayos de *pull-down*, como se describe en el apartado de “Materiales y métodos”. Se muestra un *western blot* representativo de cada GTPasa (Rho, Rac y Cdc42). Los diagramas muestran los análisis densitométricos de la actividad de Rho, Rac y Cdc42, normalizada con los lisados totales y relativizada respecto a los valores de las células WT (media  $\pm$  S.E.M. de 5-6 experimentos independientes). \*Estadísticamente significativo respecto a los MEFs WT.

## 4.2.2 Caveolina-1 regula el reclutamiento de Rac a la membrana plasmática.

### 4.2.2.1 La internalización de CEMMs mediada por Cav1 afecta a la translocación de Rac a la membrana plasmática

En el caso de Rac está bien descrito que, aparte de la carga de GTP, para su interacción con las subsiguientes proteínas efectoras es necesaria la translocación de Rac a determinadas regiones de la membrana plasmática, denominadas CEMMs (microdominios de membrana ricos en colesterol). La caveola es uno de los subtipos de CEMM mejor caracterizados, estando Cav1 implicada en el tráfico de estos dominios, que son internalizados cuando la célula pierde la adhesión a sustrato mediada por integrinas. Por consiguiente, sería esperable que en células Cav1<sup>-/-</sup> despegadas de la matriz estuviera afectada la translocación de Rac a la membrana por bloqueo de la internalización de estos dominios lipídicos. Para contrastar esta hipótesis se utilizó la línea celular M21L procedente de melanoma humano, en la cual se ha perdido la expresión de Cav1. Se generaron líneas de M21L que expresan el gen de Cav1 de forma estable (M21L-cav1) (Figura 16 a). Se comprobó que en condiciones de adhesión a sustrato, tanto las M21L como las M21L-cav1 mostraban niveles similares del gangliósido GM1 (usado como marcador de CEMMs), tanto en la fracción de membrana como en extractos totales de proteína. No obstante, cuando estas células son puestas en suspensión mediante el despegamiento de la matriz extracelular, GM1 desaparece prácticamente de las fracciones de membrana de las M21L-cav1, mientras que en las M21L en suspensión se da una retención de GM1 en la superficie celular (Figura 16 b). En estas células despegadas de sustrato se detectó, como esperábamos, una mayor proporción de Rac en membrana en las M21L, pese a la pérdida de

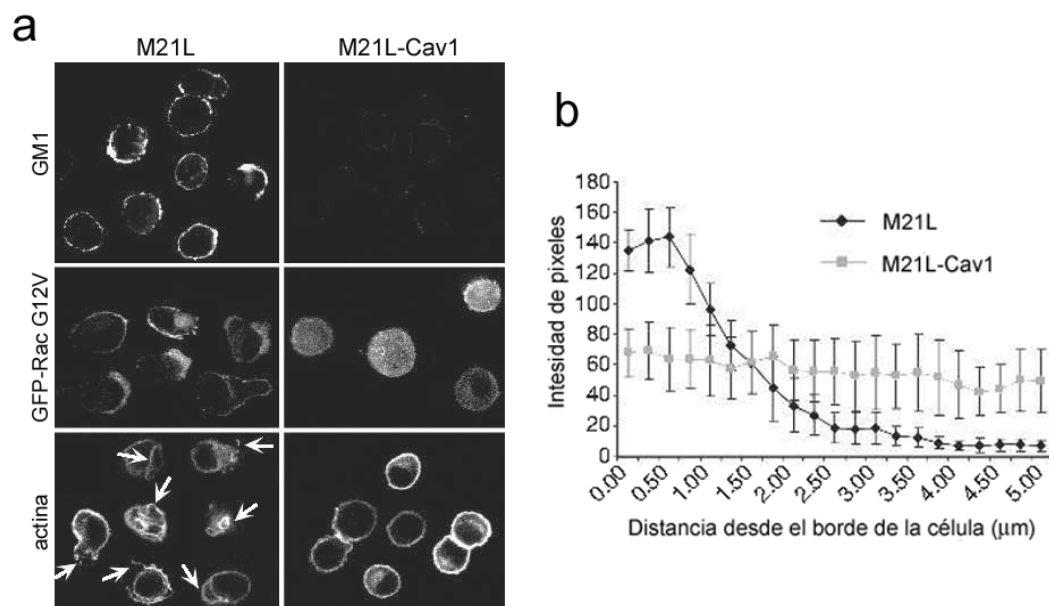
adhesión celular, comparado con lo que ocurre en las M21L-cav1. Además las M21L mantienen la capacidad de responder a estimulación por suero estando en suspensión, pues presentan un incremento en la translocación de Rac a la membrana plasmática cuando son tratadas con 10% FBS tras 24 h creciendo en ausencia del mismo (Figura 16 c). Estos resultados indican que Cav1 es imprescindible para la internalización de GM1, y que a través de este mecanismo, Cav1 podría estar regulando la unión de Rac a la membrana, controlando de esta manera su interacción con las proteínas efectoras.



**Figura 16. La ausencia de Cav1 lleva a un bloqueo en la internalización de los CEMMs y a un aumento en la translocación de Rac a la membrana en células despegadas de la matriz.** (a) Las células de melanoma M21L y las reconstituidas de forma estable con Cav1 fueron lisadas y se analizaron los niveles de caveolina-1 por *western blot*. (b) Las células M21L y M21L-Cav1 se dejaron en adhesión, o bien fueron despegadas de sustrato y mantenidas en suspensión durante 2 horas, tras lo cual se analizaron los niveles totales y en superficie de GM1, usado como marcador de CEMMs (ver sección “Materiales y métodos”). Para normalizar, se utilizó integrina  $\beta 1$  como medida de proteína total en membrana en cada muestra. Los números representan la cantidad relativa de GM1 para cada condición (normalizando respecto a la condición de adhesión en presencia de Cav1). (c) Se estudió la translocación de Rac a la fracción de membrana en células M21L y M21L-Cav1 despegadas de sustrato, en presencia y en ausencia de suero. Los valores representan la proporción de Rac presente en la fracción particulada de la célula (medias  $\pm$  S.E.M.).

La asociación de Rac a la membrana es regulada de forma específica e independiente de los niveles de carga de GTP (31), pero este factor también afecta a la localización. Para descartar la posibilidad de que los cambios en la localización de Rac se deban a variaciones en su unión a GTP, se estudió el comportamiento del mutante activo de Rac (GFP-Rac G12V). Este mutante está máximamente cargado con GTP, y por tanto, cambios en su localización reflejan solamente variaciones en la regulación de su movilidad intracelular. Se comprobó que las M21L retienen GFP-Rac G12V en membrana cuando son puestas en suspensión, mientras que Rac tiene una localización citosólica en las M21L-cav1 (Figura 17 a). Estos resultados fueron confirmados midiendo la intensidad de píxeles con GFP-Rac G12V en el borde de las células (Figura 17 b).

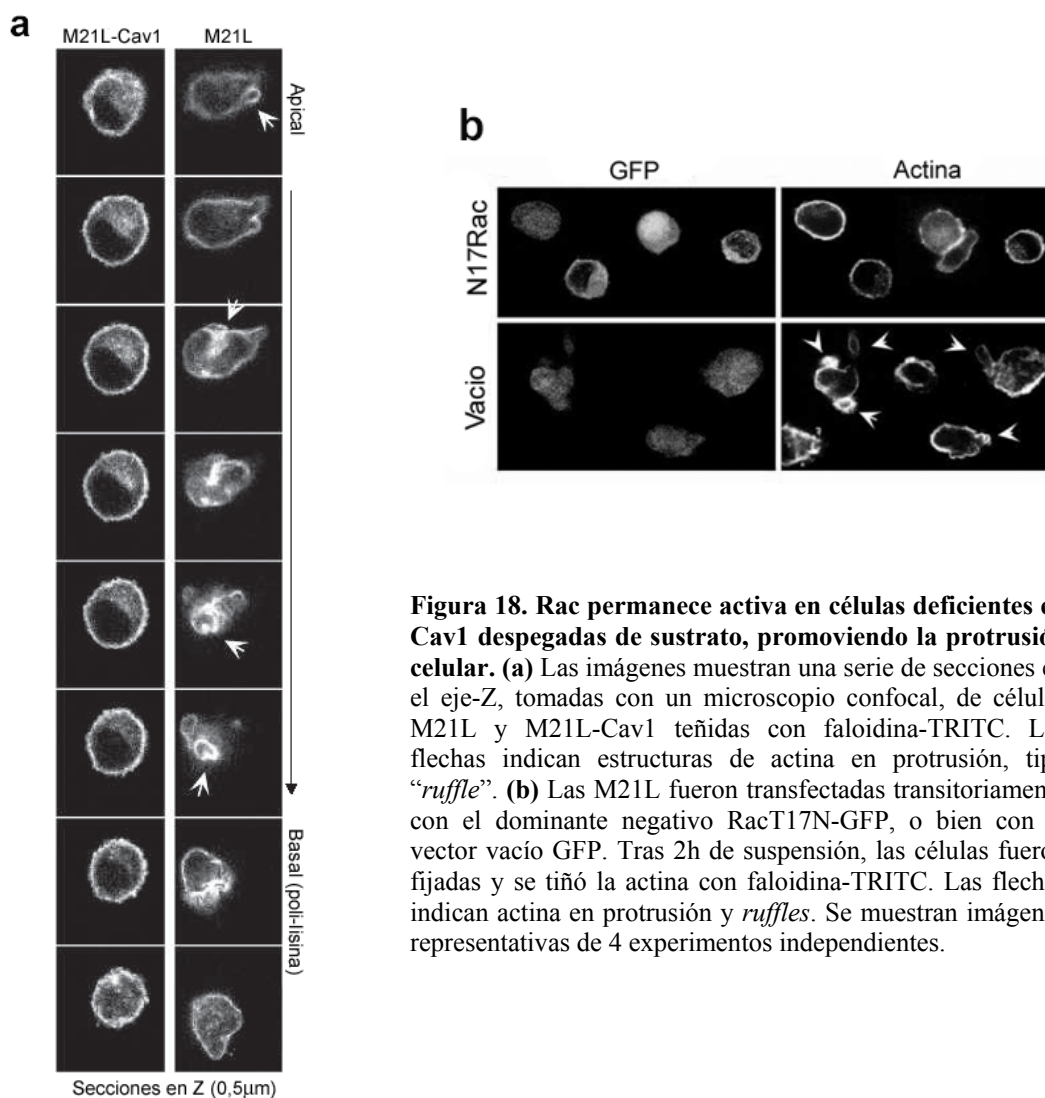




**Figura 17. En ausencia de Cav1, el mutante activo de Rac (G12V) queda retenido en superficie cuando las células son despegadas de sustrato. (a)** Las células M21L y M21L-Cav1 fueron mantenidas en suspensión durante 2 horas, a continuación se tiñeron con CTxB-FITC para marcar GM1 en superficie (paneles superiores), se fijaron y se tiñeron con faloidina-TRITC (paneles inferiores). En los paneles medios se muestra la expresión de RacG12V-GFP. Las flechas indican protrusiones y estructuras tipo “*ruffle*”. **(b)** La localización intracelular de RacG12V-GFP en **a** fue estudiada midiendo la intensidad de fluorescencia de los píxeles en una línea de 5 μm trazada desde el borde de cada célula. Los valores muestran las medias ± S.E.M.

#### 4.2.2.2 Las células Cav1<sup>-/-</sup> son incapaces de silenciar las vías de señalización activadas por Rac tras la pérdida de adhesión a la matriz extracelular

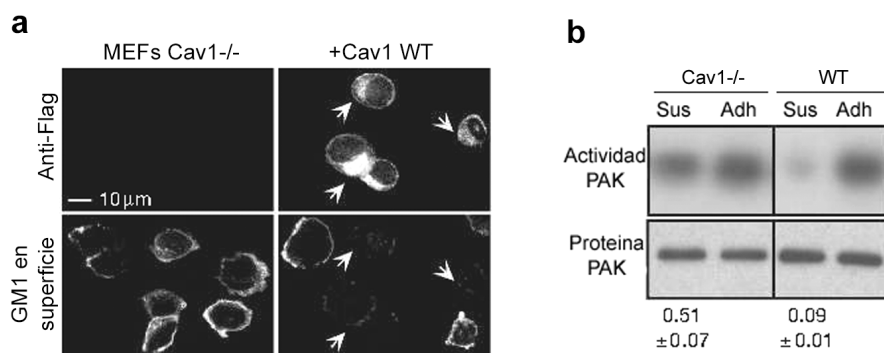
El aumento en la localización de Rac en membrana podría dar lugar a cambios en las funciones celulares reguladas por esta GTPasa. Con el fin de analizar la función de algunos de los efectores que son activados por Rac, se examinó la organización de la F-actina después de despegar las células del sustrato. Tras incubar las células en suspensión durante 2 horas, las M21L-cav1 adquirirían una forma totalmente redondeada sin ningún tipo de protrusión en la superficie celular, mientras que las M21L adoptaban formas asimétricas con estructuras de protrusión ricas en F-actina parecidas a los llamados *ruffles* (Figura 17 a, paneles de abajo), que son mostradas de forma más clara en secciones seriadas en el eje Z (Figura 18 a). Estas estructuras son dependientes de la actividad de Rac, puesto que desaparecen cuando las células M21L son transfectadas con el dominante negativo GFP-Rac T17N (Figura 18 b).



**Figura 18. Rac permanece activa en células deficientes en Cav1 despegadas de sustrato, promoviendo la protrusión celular.** (a) Las imágenes muestran una serie de secciones en el eje-Z, tomadas con un microscopio confocal, de células M21L y M21L-Cav1 teñidas con faloidina-TRITC. Las flechas indican estructuras de actina en protrusión, tipo “ruffle”. (b) Las M21L fueron transfectadas transitoriamente con el dominante negativo RacT17N-GFP, o bien con el vector vacío GFP. Tras 2h de suspensión, las células fueron fijadas y se tiñó la actina con faloidina-TRITC. Las flechas indican actina en protrusión y *ruffles*. Se muestran imágenes representativas de 4 experimentos independientes.

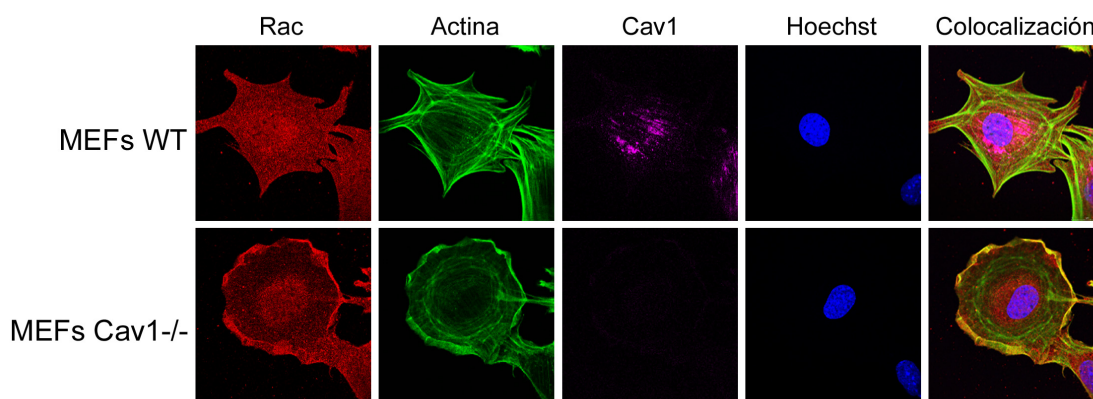
Estos experimentos se repitieron en MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup>. Al igual que lo que ocurría en M21L, cuando los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> son puestos en suspensión, GM1 es retenido en la membrana plasmática. Sin embargo, en presencia de Cav1, GM1 desaparece prácticamente de la superficie celular (Figura 19 a). Los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> también conservan protrusiones ricas en F-actina tras dos horas en suspensión, que desaparecen si se recupera la expresión de Cav1, y resultados preliminares indican que hay una mayor translocación de Rac a la membrana (datos no mostrados). En estas células se realizó un segundo abordaje con la intención de explorar la interacción de Rac con sus efectores. Uno de los efectores más conocidos y estudiados es la proteína Pak1. La actividad de Pak1 fue testada en MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> con ensayos de “quinasa en gel”, utilizando como sustrato de fosforilación MBP. La actividad quinasa de Pak1 resultó estar fuertemente inhibida en los fibroblastos WT puestos en suspensión, mientras que los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> en suspensión mantenían una actividad de aproximadamente la mitad de la registrada en adhesión (Figura 19 b).





**Figura 19. Los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> despegados de su sustrato presentan un bloqueo de la internalización de GM1 y una hiperactivación de la vía Rac/PAK en suspensión. (a)** MEFs Cav1<sup>-/-</sup> y los Cav1<sup>-/-</sup> transfectados con Cav1 fueron mantenidos en suspensión durante 2 horas, tras las cuales se realizó un marcaje de GM1 en superficie con CTxB-FITC, y se usaron anticuerpos anti-Flag para detectar la expresión de Cav1 exógena. Las flechas señalan células transfectadas. En las imágenes se muestran células representativas de 4 experimentos independientes. **(b)** MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> cultivados 24 h sin suero, fueron despegados de sustrato y tras 2 h en suspensión, se estimularon con 10% FBS durante 10 min. A continuación se realizó un ensayo de quinasa en gel para analizar la actividad de PAK en estas células. Los valores numéricos indican el cociente entre la actividad de PAK en suspensión y la actividad en adhesión para cada línea celular (media ± S.E.M. de 4 ensayos independientes)

Por tanto, todos estos datos demuestran que caveolina-1 es fundamental para la regulación de la asociación de Rac a la membrana plasmática en células despegadas de la matriz.



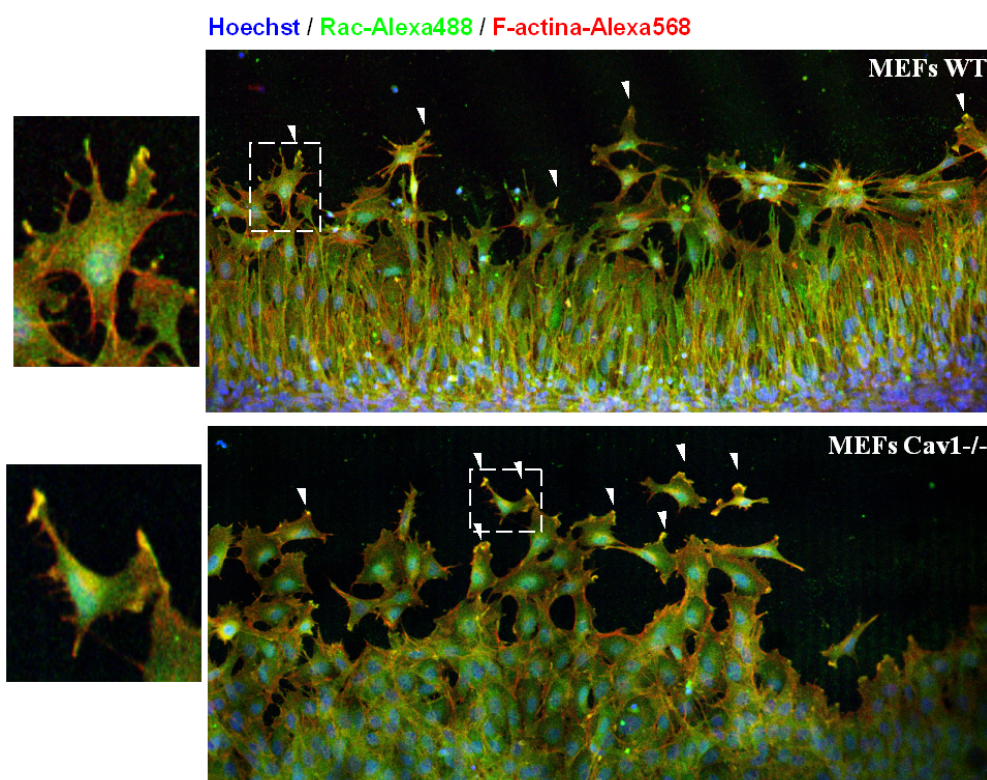
**Figura 20. Rac presenta una mayor translocación a la membrana plasmática en fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> adheridos a FN y colocaliza con estructuras de actina tipo “ruffle”.** MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron sembrados sobre una matriz de FN (5µg/ml), se fijaron y se llevaron a cabo inmunofluorescencias con anticuerpos anti-Rac1 y anti-Cav1. La actina se marcó con faloidina-Alexa488 y los núcleos con Hoechst.

#### 4.2.3 Localización subcelular de Rac en fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> adheridos a FN

Para comprobar si Cav1 regula la asociación de Rac a la membrana plasmática en condiciones de anclaje a matriz, se analizó la localización de Rac por inmunofluorescencia en MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> en adhesión. En la Figura 20 se puede apreciar un patrón claro de membrana en el caso de los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>, mientras que Rac tiene una distribución

predominantemente citoplasmática en los WT. En las células Cav1<sup>-/-</sup>, Rac se encuentra muchas veces colocalizando con estructuras periféricas del citoesqueleto de actina, posiblemente en fases de protrusión.

Cuando analizamos este parámetro en ensayos de cierre de herida, observamos que la localización de Rac en membrana se hace más evidente en los MEFs WT. Sin embargo, mientras los MEFs WT concentran el Rac activo en una única lamela dominante que determina el frente de avance, los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> generalmente presentan más de una lamela con tinción intensa de Rac (Figura 21), lo cual indica alteraciones en la maquinaria de polarización. Las implicaciones de este resultado se discuten más adelante.

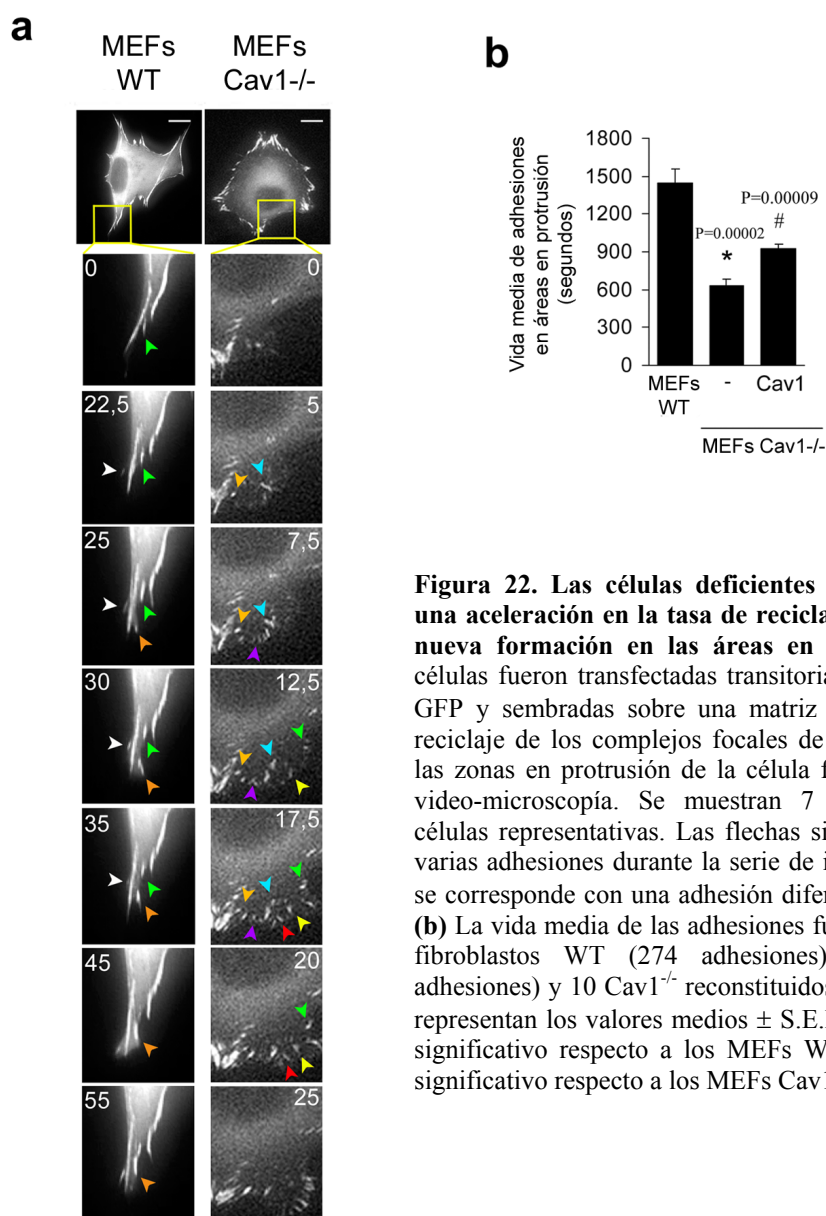


**Figura 21. Localización subcelular de Rac durante la migración dirigida de fibroblastos.** MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron crecidos hasta confluencia. Se realizaron entonces incisiones en las monocapas y tras 8 horas de cierre de herida, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-Rac1 (verde), la actina se marcó con faloidina-Alexa568 (rojo) y los núcleos con Hoechst (azul). Las puntas de flecha señalan ejemplos de protrusiones de actina (lamelas) con alta concentración de Rac (en amarillo por superposición de los canales rojo-verde).

### 4.2.4 Consecuencias biológicas de los defectos de activación de las RhoGTPasas.

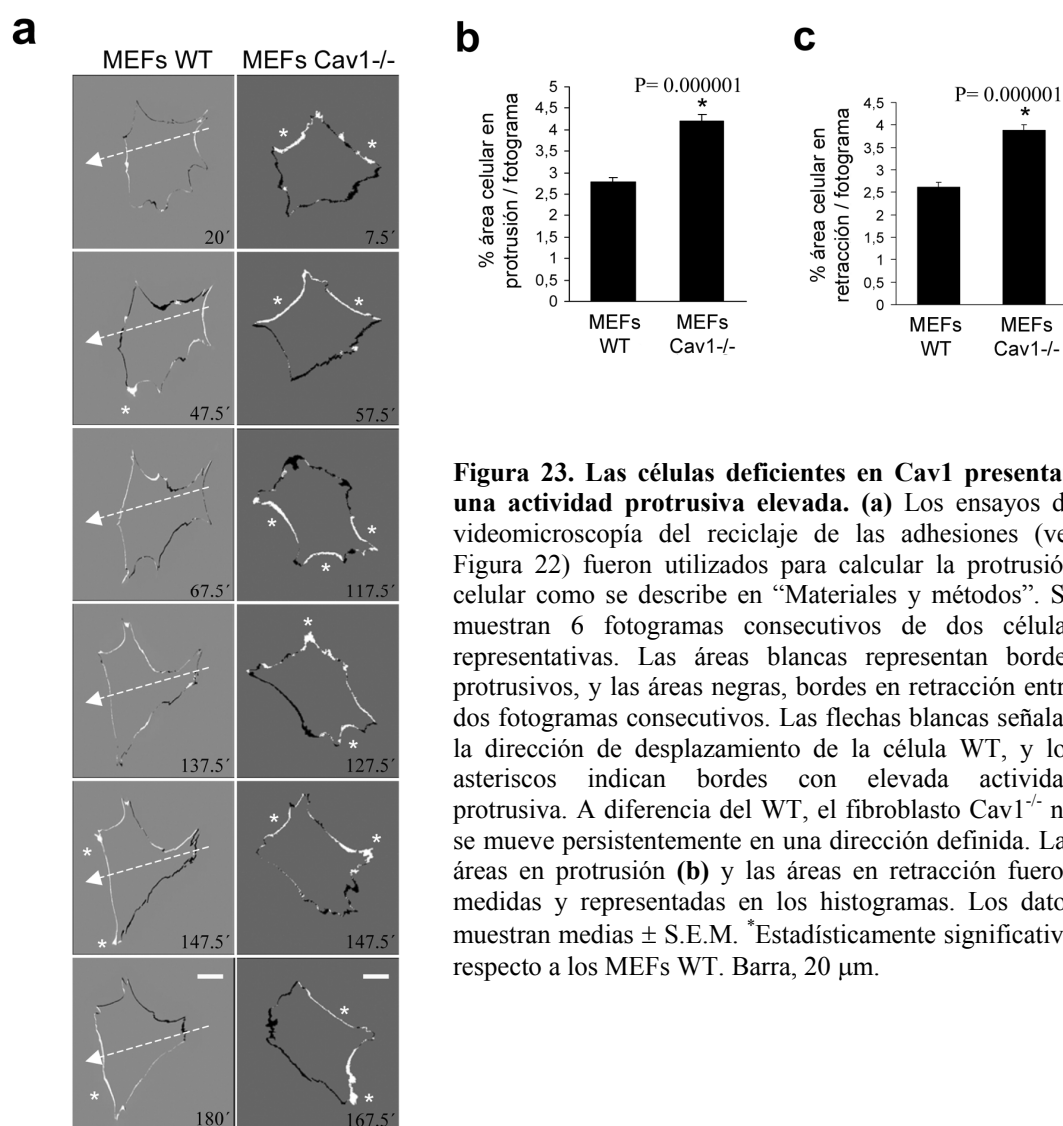
Para evaluar las posibles consecuencias de estas alteraciones en las GTPasas, se realizó un análisis exhaustivo de dos de los procesos en los que intervienen estas proteínas, la protrusión celular y el reciclaje de las adhesiones focales. En primer lugar se hicieron ensayos de videomicroscopía de MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> transfectados con paxilina-GFP, y en ellos se analizó

la vida media de las adhesiones de nueva formación que se generan en las áreas en protrusión de la célula. Se observó una vida significativamente más corta para los complejos focales de las células Cav1<sup>-/-</sup>, en comparación con las adhesiones de las WT (Figura 22; Videos 1,2). Cuando se re-introdujo el gen de Cav1 en las MEFs Cav1<sup>-/-</sup>, se observó una reversión del fenotipo. Este aumento en la velocidad de reciclaje de las estructuras de adhesión en las MEFs Cav1<sup>-/-</sup> se correlaciona con una actividad de Rho disminuida, corroborando el resultado, puesto que Rho juega un papel esencial en la maduración de complejos focales a adhesiones focales. Asimismo, el incremento en la actividad de Rac y Cdc42 también estaría apoyando el hecho de que haya un mayor número de complejos focales inmaduros en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>, puesto que estas GTPsas intervienen en las primeras etapas de formación de los complejos de adhesión (Figura 22 a, áreas amplificadas).



**Figura 22. Las células deficientes en Cav1 presentan una aceleración en la tasa de reciclaje de adhesiones de nueva formación en las áreas en protrusión. (a)** Las células fueron transfectadas transitoriamente con paxilina-GFP y sembradas sobre una matriz de FN (5µg/ml). El reciclaje de los complejos focales de nueva formación en las zonas en protrusión de la célula fue monitorizado por video-microscopía. Se muestran 7 fotogramas de dos células representativas. Las flechas siguen la dinámica de varias adhesiones durante la serie de imágenes (cada color se corresponde con una adhesión diferente). Barra, 20 µm. **(b)** La vida media de las adhesiones fue determinada en 16 fibroblastos WT (274 adhesiones), 15 Cav1<sup>-/-</sup> (376 adhesiones) y 10 Cav1<sup>-/-</sup> reconstituidos con Cav1 (354). Se representan los valores medios ± S.E.M. \*Estadísticamente significativo respecto a los MEFs WT. #Estadísticamente significativo respecto a los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>.

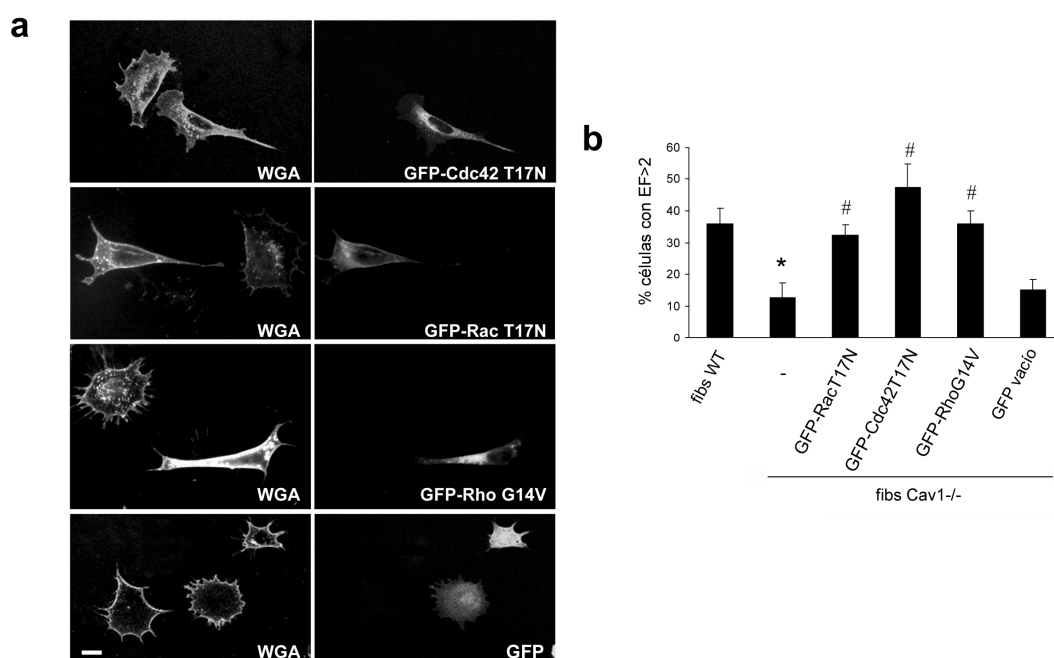
Para evaluar si la hiperactividad de Rac y Cdc42 tenía repercusiones en los procesos de protrusión de membrana, se efectuaron análisis por videomicroscopía de las actividades de protrusión y retracción de los bordes de las células. Se detectó un aumento significativo de ambas actividades en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> comparado con los MEFs WT (Figura 23; Videos 3,4). Observando detenidamente los videos, se puede apreciar que la actividad protrusiva en los MEFs WT es bastante direccional, es decir, está orientada fundamentalmente hacia la dirección de desplazamiento de la célula, mientras que la retracción sucede principalmente en el polo posterior de la misma. Sin embargo, en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> tanto la protrusión como la retracción se dan por todo el perímetro de la célula (Figura 23; Videos 3,4).



**Figura 23. Las células deficientes en Cav1 presentan una actividad protrusiva elevada.** (a) Los ensayos de videomicroscopía del reciclaje de las adhesiones (ver Figura 22) fueron utilizados para calcular la protrusión celular como se describe en “Materiales y métodos”. Se muestran 6 fotogramas consecutivos de dos células representativas. Las áreas blancas representan bordes protrusivos, y las áreas negras, bordes en retracción entre dos fotogramas consecutivos. Las flechas blancas señalan la dirección de desplazamiento de la célula WT, y los asteriscos indican bordes con elevada actividad protrusiva. A diferencia del WT, el fibroblasto Cav1<sup>-/-</sup> no se mueve persistentemente en una dirección definida. Las áreas en protrusión (b) y las áreas en retracción fueron medidas y representadas en los histogramas. Los datos muestran medias  $\pm$  S.E.M. \*Estadísticamente significativo respecto a los MEFs WT. Barra, 20  $\mu$ m.



El conjunto de estos resultados podría indicar que los cambios en la actividad de las RhoGTPasas podrían ser responsables, al menos en parte, de los defectos morfológicos observados en los fibroblastos deficientes en Cav1. Para corroborar esta hipótesis, se quisieron recuperar los niveles de actividad de las RhoGTPasas transfectando los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> con el mutante constitutivamente activo de Rho (GFP-Rho G14V) y los dominantes negativos de Rac (GFP-Rac T17N) y Cdc42 (GFP-Cdc42 T17N). La expresión de cada una de estas construcciones por separado fue capaz de recuperar el fenotipo elongado de las células, así como los valores de EF (Figura 24). Sin embargo este resultado es difícil de interpretar dada la compleja red de interrelaciones que se da entre las cascadas de señales de Rho, Rac y Cdc42. Los datos obtenidos sugieren que el desequilibrio del balance que existe entre los distintos miembros de las RhoGTPasas podría estar desencadenando los defectos en polarización celular observados en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>.



**Figura 24. El mutante activo de Rho y los dominantes negativos de Rac y Cdc42 recuperan la morfología elongada y polarizada de los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>.** (a) Los fibroblastos (fibs) Cav1<sup>-/-</sup> fueron transfectados transitoriamente con RhoG14V-GFP, RacT17N-GFP, Cdc42T17N-GFP, o el vector vacío EGFP-C1, usado como control. Las células transfectadas fueron sembradas sobre una matriz de FN, y tras 4 horas de adhesión, se realizó una tinción de membrana con WGA-TRITC con el fin de resaltar el perímetro de las células para su posterior análisis automatizado con Metamorph. Barra, 20  $\mu$ m. (b) El factor elíptico (EF) fue calculado en 150-181 células de cada tipo celular, y se muestra el porcentaje de las células con EF>2. Los valores indican medias  $\pm$  S.E.M. \*Estadísticamente significativo respecto a los MEFs WT,  $P=0,00005$ ; #Estadísticamente significativo respecto a los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> (Rac T17N,  $P=0.0061$ ; Cdc42 T17N,  $P=0.00966$ ; Rho G14V,  $P=0.0073$ ).

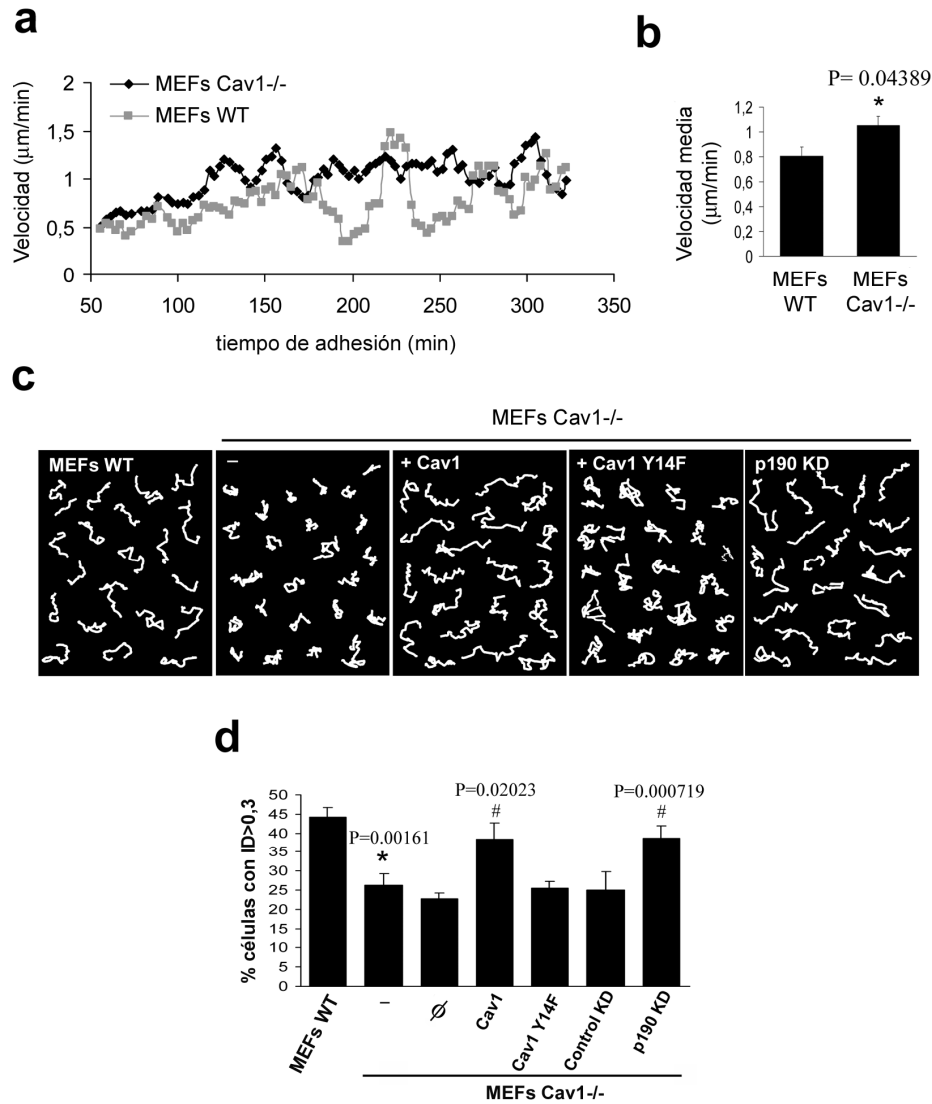
### **4.3 La migración direccional se encuentra alterada en las células deficientes en Cav1.**

#### **4.3.1 Migración direccional en ausencia de estímulos externos**

En numerosos estudios anteriores se ha sugerido que Cav1 juega un papel esencial en la motilidad celular. Sin embargo hay cierta controversia en cuanto al efecto regulador que ejerce esta proteína. En un intento de ayudar a esclarecer esta cuestión, se realizaron diversos ensayos de migración utilizando fibroblastos deficientes en Cav1. En un primer abordaje se emplearon técnicas de videomicroscopía para estudiar la migración de las células WT y Cav1<sup>-/-</sup> puestas sobre una matriz de FN y en ausencia de estímulos externos quimiotácticos. En estas condiciones, se observó que la velocidad de desplazamiento de las MEFs Cav1<sup>-/-</sup> era ligeramente superior que en las MEFs WT (Figura 25 a,b). Sin embargo, lo más importante a resaltar es el cambio drástico que tiene lugar en los patrones de migración celular ante la pérdida de Cav1 (Videos 5,6). Los fibroblastos WT muestran cierta direccionalidad intrínseca o persistencia en migración, es decir, tienden a migrar en una misma dirección durante periodos de tiempo relativamente largos aun en ausencia de gradientes quimiotácticos. Sin embargo, los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> presentan una pérdida significativa de este sentido de direccionalidad. Para medir este parámetro se obtuvieron y analizaron las trayectorias recorridas por cada célula individual durante un periodo de 10 horas con ayuda de programas informáticos. Con el fin de visualizar las diferencias de la forma más clara posible se representaron los movimientos de varias células representativas en la Figura 25c. Los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> mostraron un desplazamiento neto más corto (entendido como la distancia linear más corta entre el punto inicial y el punto final del recorrido de la célula), comparado con los fibroblastos WT, que se mueven por trayectorias más largas y de una forma más directa. Para cuantificar estas diferencias, se calculó el índice de direccionalidad (ID), definido como el cociente entre la distancia neta dividido por la distancia total recorrida por la célula. Los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> mostraron una reducción importante en el ID (Figura 25 d). Cuando se rescata la expresión de Cav1 en estas células, los valores de ID se recuperan (Figura 25 c,d; Video 7). Estos resultados indican que caveolina-1 promueve una migración persistente, es decir, favorece que las células tengan un sentido interno de direccionalidad.

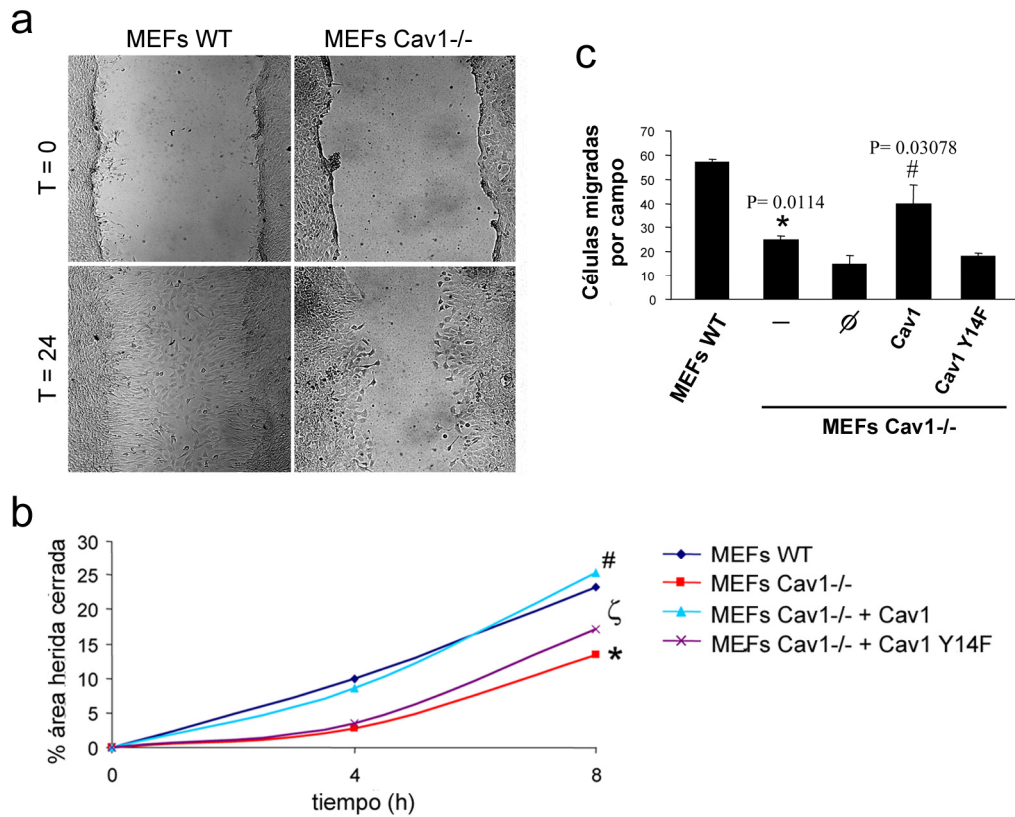
#### **4.3.2 Respuesta quimiotáctica**

Con el objetivo de analizar la migración direccional promovida por estímulos externos, se llevaron a cabo ensayos de cierre de herida in vitro y se analizó la respuesta quimiotáctica en cámaras Transwell. Tanto la velocidad de cierre de las heridas en monocapa (Figura 26 a,b; Videos 8, 9) como la quimiotaxis (Figura 26 c) resultaron estar fuertemente disminuidas en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>. La re-expresión de Cav1 en estas células consiguió rescatar ambas respuestas (Figura 26; Video 10).



**Figura 25. La persistencia direccional en migración aleatoria está alterada en fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> y es rescatada inhibiendo la expresión de p190RhoGAP y re-expresando Cav1, pero no Cav1Y14F.** MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron sembrados sobre FN (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y su patrón de migración en ausencia de gradientes quimiotácticos fue monitorizado por video-microscopía durante 10 h (fotogramas a intervalos de 8 min). **(a)** La velocidad instantánea de 580-600 células de cada tipo celular fue cuantificada y representada en la gráfica frente al tiempo de adhesión a FN. En el transcurso de estos ensayos, la confluencia de las células para ambas poblaciones fue equivalente (no mostrado). **(b)** El histograma representa la media de las velocidades durante el periodo 90-330 min, durante el cual las velocidades instantáneas son más estables. **(c)** Las líneas blancas muestran trayectorias representativas de los desplazamientos de las diferentes líneas celulares, indicadas en la parte superior de cada panel. Con el fin de evitar espacios vacíos, estas figuras fueron creadas agrupando en cada panel varias trayectorias escogidas aleatoriamente (121). **(d)** El ID (índice de direccionalidad) fue calculado con la ayuda de los programas informáticos Metamorph y Matlab. Los histogramas muestran el porcentaje de células con ID>0,3 de cada línea celular. Este valor (0,3) es la media más alta de todas las condiciones experimentales analizadas, y por tanto ID>0,3 representa células con alta direccionalidad en la migración. Los datos expresan la media  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos independientes (n = 300-500 células de cada línea celular). \*Estadísticamente significativo respecto a los MEFs WT. #Estadísticamente significativo respecto a los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>. Ø, vector vacío; p190 KD, MEFs Cav1<sup>-/-</sup> transfectadas de forma estable con RNAi de p190RhoGAP; control KD, MEFs Cav1<sup>-/-</sup> transfectadas con un RNAi control.

De todos los resultados obtenidos podemos concluir que la caveolina-1 es requerida en los fibroblastos tanto para poder mostrar cierta persistencia direccional en migración en ausencia de estímulos quimiotácticos como para poder responder con una migración dirigida ante estímulos externos, mientras que la presencia de caveolina parece ralentizar ligeramente la velocidad de la migración aleatoria.

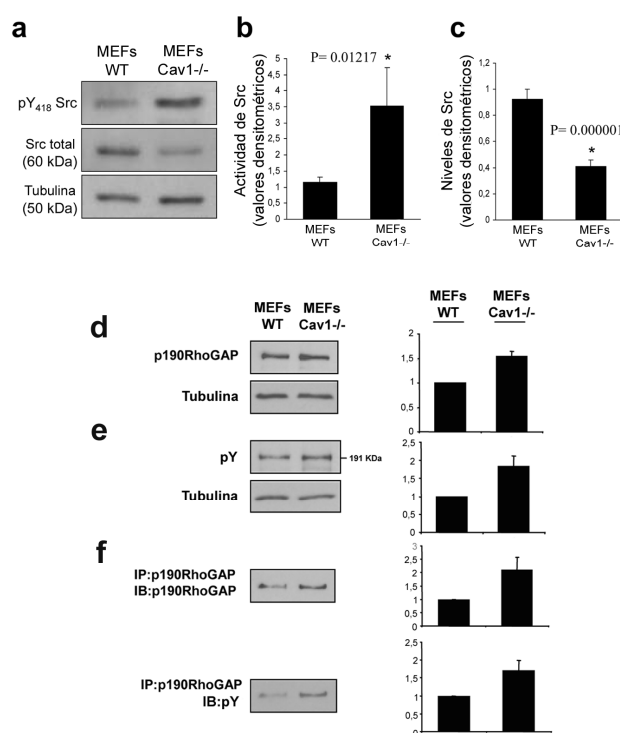


**Figura 26. La migración direccional frente a estímulos externos está alterada en ausencia de Cav1.** (a) MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron cultivados hasta formar una monocapa y se realizaron incisiones en ellas con una punta de pipeta de 1 mm de grosor aproximadamente. El cierre de herida fue monitorizado por video-microscopía. Las imágenes muestran una herida representativa WT y otra Cav1<sup>-/-</sup> a tiempo 0 y 24 horas tras la incisión. (b) Representación gráfica del cierre de herida en MEFs WT, MEFs Cav1<sup>-/-</sup> y MEFs Cav1<sup>-/-</sup> reconstituidos con Cav1 y Cav1Y14F. El porcentaje de cierre de herida fue calculado a las 4 y 8 horas de haber realizado la incisión en las monocapas. Las barras de error muestran S.E.M. de 6 experimentos independientes. Valores P para los puntos de 4 h: \*, P=0.024 (MEFs Cav1<sup>-/-</sup> versus WT); #, P=0.033 (MEFs Cav1<sup>-/-</sup>+Cav1 versus Cav1<sup>-/-</sup>); ζ, P=0.039 (MEFs Cav1<sup>-/-</sup>+Cav1Y14F versus WT). Valores P para los puntos de 8 h: \*, P=0.020 (MEFs Cav1<sup>-/-</sup> versus WT); #, P=0.042 (MEFs Cav1<sup>-/-</sup>+Cav1 versus Cav1<sup>-/-</sup>); ζ, P=0.049 (MEFs Cav1<sup>-/-</sup>+Cav1Y14F versus WT). (c) Cámaras Transwell con los filtros recubiertos con FN (5μg/ml) fueron empleadas para analizar la respuesta quimiotáctica de MEFs WT, MEFs Cav1<sup>-/-</sup> y MEFs Cav1<sup>-/-</sup> reconstituidos con Cav1 y Cav1Y14F, o transfectados con el vector vacío (∅), utilizando los factores de crecimiento presentes en suero bovino fetal como estímulo. Se dejaron migrar las células durante 4 horas, tras las cuales se cuantificaron al microscopio los fibroblastos que habían atravesado los poros y alcanzado la cara inferior del filtro. Se analizaron 5 campos aleatorios de cada Transwell. En la gráfica se muestran las medias ± S.E.M. de 4 experimentos independientes. \*Estadísticamente significativo respecto a los MEFs WT. #Estadísticamente significativo respecto a los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>.



#### 4.4 Src y p190RhoGAP están implicados en la pérdida de polarización celular de los fibroblastos deficientes en Cav1.

Se sabe que caveolina-1 puede ser fosforilada por diversas quinasas de tirosina, entre ellas Src. De hecho, fue inicialmente descrita como el principal sustrato de Src en líneas celulares transformadas por el oncogen v-src (54). Por otro lado se ha descrito que la caveolina-1 fosforilada en tirosina-14 (pY14-Cav1) puede inhibir Src a través del reclutamiento y activación de la quinasa CSK (14, 132). Considerando este hecho se planteó la hipótesis de que en ausencia de Cav1, la actividad de Src puede verse afectada. Se evaluó entonces el grado de fosforilación de Src en tirosina-418 en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>, y se encontró que presentaban un incremento significativo en el estado de activación basal de Src (Figura 27 a, cuantificado en 26b). Este hecho va acompañado de una disminución en la cantidad de Src total en los extractos proteicos (Figura 27 c). No se llegaron a comprobar los niveles de expresión de Src, pero se sabe que hay una mayor tasa de degradación proteica de Src vía proteosoma cuando está fosforilada en tirosina-418 (59), que en principio sería la explicación más factible al fenómeno observado.



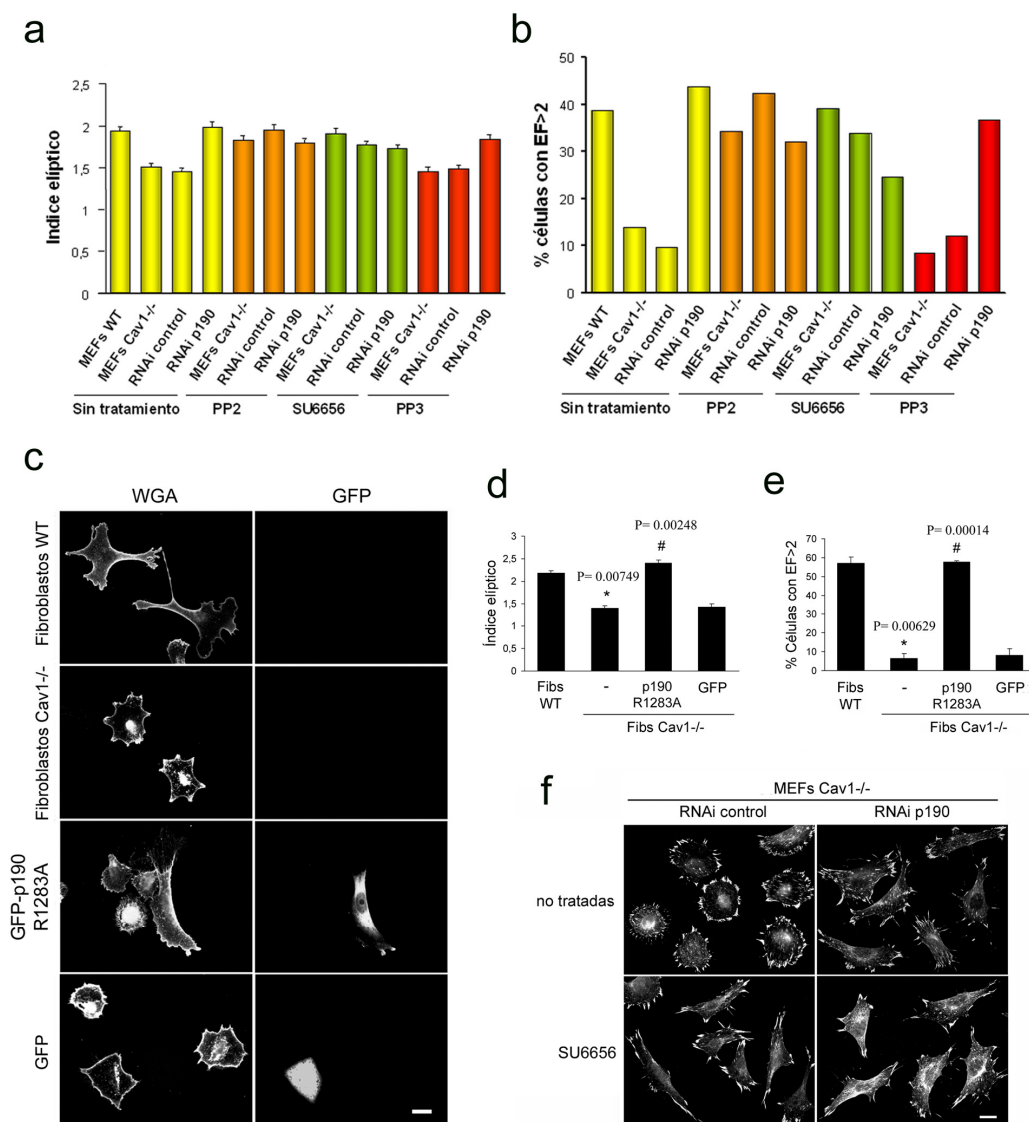
**Figura 27. Los niveles de fosforilación de Src y p190RhoGAP están aumentados en ausencia de Cav1.** (a) MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron lisados y los niveles de Src total y Src activado fueron analizados por *western blot* utilizando anticuerpos anti-Src y el fosfo-específico anti-pY418-Src, respectivamente. Se muestran *blots* representativos de 5 ensayos independientes. (b) La actividad de Src fue determinada por densitometría y se expresó como el cociente pY418-Src/Src. (c) Los niveles de la proteína Src fueron normalizados con los niveles de tubulina en cada muestra. Se representan los valores medios  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos independientes. (d) MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> fueron lisados y se analizaron los niveles de p190RhoGAP en el lisado total, normalizando con los niveles de tubulina. (e) Se utilizaron los mismos lisados para analizar proteína fosforilada en tirosina (4G10), normalizando con tubulina. (f) La proteína p190RhoGAP fue inmunoprecipitada en los MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup>, y se determinaron los niveles de p190RhoGAP (arriba) y los niveles de fosforilación de dicha proteína (abajo) por *western blot*. En los histogramas se muestran los análisis densitométricos, con valores relativos a los de las células WT. Se muestran medias  $\pm$  S.E.M. de 5 ensayos.

La relevancia de Src en multitud de cascadas de señalización comunes a las RhoGTPasas llevo a pensar en la posibilidad de que Src estuviese implicada en las alteraciones morfológicas observadas en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>. Para contrastar esta hipótesis, se bloqueó la activación de Src tratando los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> con dos inhibidores farmacológicos de las quinasas de la familia de Src, PP2 y SU6656. Ambos tratamientos consiguieron reestablecer el fenotipo morfológico de las MEFs WT (Figura 28 a, b, f).

Puesto que Src regula Cav1 por medio de su fosforilación en tirosina-14, y que se requiere pY14Cav1 para reclutar CSK, sería de esperar según nuestra hipótesis que el bloqueo de la fosforilación de Cav1 en ese residuo impidiese la adquisición de un fenotipo WT. Para probar este hecho, los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> fueron transfectados de forma estable con un mutante de Cav1 no fosforilable, Cav1Y14F (Figura 12 d), y se comprobó que con esta transfección no se revertían los cambios morfológicos (Figura 29 a), ni se recuperaba la polarización del MTOC (Figura 14 b), ni el cierre de herida in vitro (Figura 26 b), ni la direccionalidad en migración aleatoria (Figura 25 c-d), ni la respuesta quimiotáctica (Figura 26 e); todos ellos rescatados cuando se transfectaba con la Cav1 WT. Todos estos resultados subrayan la importancia de la fosforilación de Cav1 por Src en tirosina-14 para la polarización y la migración direccional de los fibroblastos de ratón.

Podemos encontrar en la bibliografía científica muchos nexos entre la actividad de Src y las RhoGTPasas. Src ha sido involucrado en la activación de Rac (72, 159) y Cdc42 (46, 101, 184). Y por otro lado, también se ha visto que puede inhibir Rho a través de la activación de p190RhoGAP (3, 9, 97). Por tanto, extrapolando este último dato a nuestro sistema, podríamos especular que la hiperactividad de Src de los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> podría llevar a la reducción observada en los niveles de Rho-GTP a través de la activación de p190RhoGAP. Se analizó entonces el estado de fosforilación de 190RhoGAP por *western blot* y por inmunoprecipitación, y se encontraron niveles de fosfo-RhoGAP ligeramente elevados en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>, lo que apoyaría el modelo planteado. Sorprendentemente, los niveles de proteína p190RhoGAP también estaban algo incrementados en las células Cav1<sup>-/-</sup> (Figura 27 d-f). Para corroborar nuestra hipótesis, se transfectaron fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> con un dominante negativo de 190RhoGAP (GFP-p190 R1283A) y se hicieron mediciones del EF. Se comprobó que efectivamente las células Cav1<sup>-/-</sup> que expresan GFP-p190 R1283A recuperan la forma elongada típica de los fibroblastos (Figura 28 c-e). El siguiente abordaje que se desarrolló fue la generación de líneas de fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> que expresan de manera estable RNAi de p190RhoGAP. En estas células se observó una recuperación del fenotipo en cuanto a la morfología celular, el patrón de estructuras de adhesión (Figura 28 a, b, f) y la direccionalidad en migración aleatoria (Figura 25 c, cuantificado en 24d). Tanto la inhibición de Src como la reducción de la expresión de p190RhoGAP llevaron, de manera individual y conjuntamente, a un rescate del fenotipo WT en los distintos aspectos estudiados. Y por otro lado, la combinación

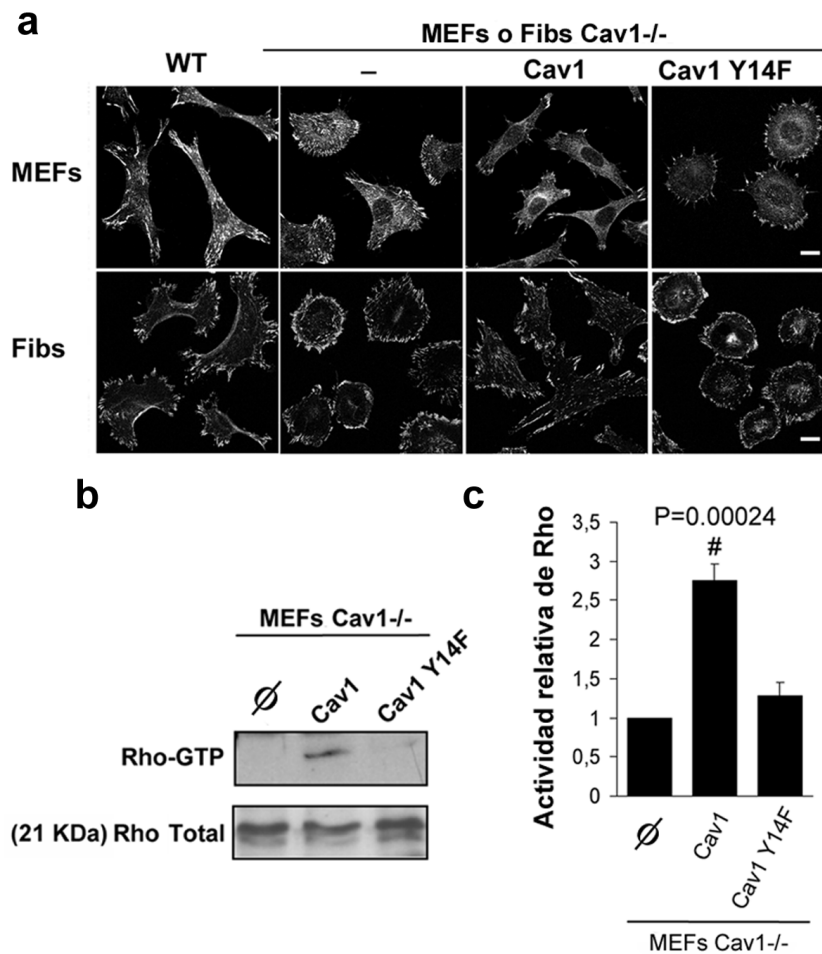
de ambos tratamientos no tuvo efectos aditivos (Figura 28 a, b, f). Estos resultados nos estarían indicando que Src y p190RhoGAP estarían implicados en una misma vía lineal que llevaría a la



**Figura 28. Tanto la inhibición de Src, como el bloqueo de la expresión de p190RhoGAP en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> rescatan el fenotipo WT. (a)** El factor elíptico (EF) fue cuantificado en MEFs Cav1<sup>-/-</sup> y MEFs Cav1<sup>-/-</sup> que expresan de forma estable un ARNi de p190RhoGAP (o su correspondiente control ARNi sin diana), sin tratar o tratadas con dos inhibidores diferentes de Src (PP2 y SU6656). PP3 fue usado como control negativo. Los datos indican la media  $\pm$  S.E.M. de 3 experimentos. **(b)** Se muestran los porcentajes de células con EF>2 para cada una de las poblaciones. Los valores representan las medias  $\pm$  S.E.M. de 3 experimentos ( $n>100$  células por condición). **(c)** Fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> fueron transfectados con el dominante negativo de RhoGAP GFP-p190 R1283A, o con el vector vacío EGFP-C1. Tanto las células transfectadas como las WT y las Cav1<sup>-/-</sup> fueron puestas sobre una matriz de FN y tras 4 h de adhesión, fueron incubadas con WGA-TRITC para marcar la membrana. Barra, 20  $\mu$ m. **(d)** El EF fue calculado con el programa informático Metamorph en 152-215 células de cada tipo, **(e)** así como el porcentaje de células con EF>2. Se representan las medias  $\pm$  S.E.M. \*Estadísticamente significativo respecto a los MEFs WT. #Estadísticamente significativo respecto a los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>. **(f)** MEFs Cav1<sup>-/-</sup> transfectados de forma estable con RNAi específico de p190RhoGAP, o bien RNAi control (sin diana), fueron cultivadas sobre FN y tratadas con SU6656 (1 $\mu$ M). Tras 4 h de adhesión, las células fueron fijadas y se realizó un marcaje de las adhesiones con anticuerpos anti-paxilina. Se muestran imágenes representativas de cada condición experimental. Barra, 20  $\mu$ m.

inhibición de Rho en los fibroblastos deficientes en Cav1. A este respecto, comprobamos que la introducción del gen de Cav1 WT en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> recupera los niveles de Rho-GTP, no así con el mutante no fosforilable Cav1Y14F (Figura 29).

Todos estos resultados subrayan la importancia del papel de Cav1 y Src en el establecimiento de la polaridad celular a través de la regulación de la actividad de Rho. Nuestros datos apoyan un modelo en el que, en ausencia de Cav1, la actividad de Src se vuelve insensible a la regulación por CSK, y la hiperactividad resultante de Src llevaría a una inactivación de Rho de manera dependiente de p190RhoGAP, lo que provocaría importantes defectos en polarización celular y en migración direccional.

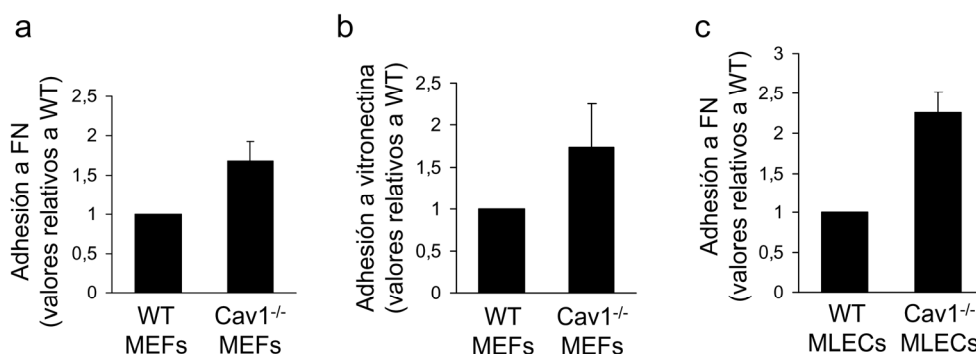


**Figura 29. El rescate del fenotipo WT en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> por reexpresión de Cav1 es dependiente de la fosforilación en tirosina 14.** (a) Las células fueron cultivadas sobre una matriz de FN, y tras 4 h de adhesión, se fijaron y marcaron con anticuerpos anti-paxilina. Se muestran imágenes representativas de cada condición experimental. Fibs, fibroblastos extraídos de timo. Barra, 20  $\mu$ m. (b) MEFs Cav1<sup>-/-</sup> transfectados de forma estable con Cav1, Cav1Y14F o con el vector vacío ( $\emptyset$ ) fueron lisados y se realizaron ensayos de *pull-down* como se describe en “Materiales y métodos”. Las proteínas unidas a GST-RBD (arriba) y los lisados totales (abajo) se resolvieron en geles de acrilamida al 13%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con anticuerpos anti-RhoA. (c) En los histogramas se representan los análisis densitométricos de la actividad relativa de Rho normalizada con los lisados totales y relativizada a las células control. Se muestran las medias  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos. #Estadísticamente significativo respecto a los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> transfectadas con el vector vacío.

#### 4.5 Las células Cav1<sup>-/-</sup> muestran alteraciones en las integrinas a distintos niveles

Las integrinas son componentes esenciales en las estructuras de adhesión de la célula, y como tales, intervienen en las distintas etapas de la motilidad celular. Dado el fenotipo de las células deficientes en Cav1, es esperable que las integrinas muestren alteraciones que estén contribuyendo al comportamiento migratorio de estas células.

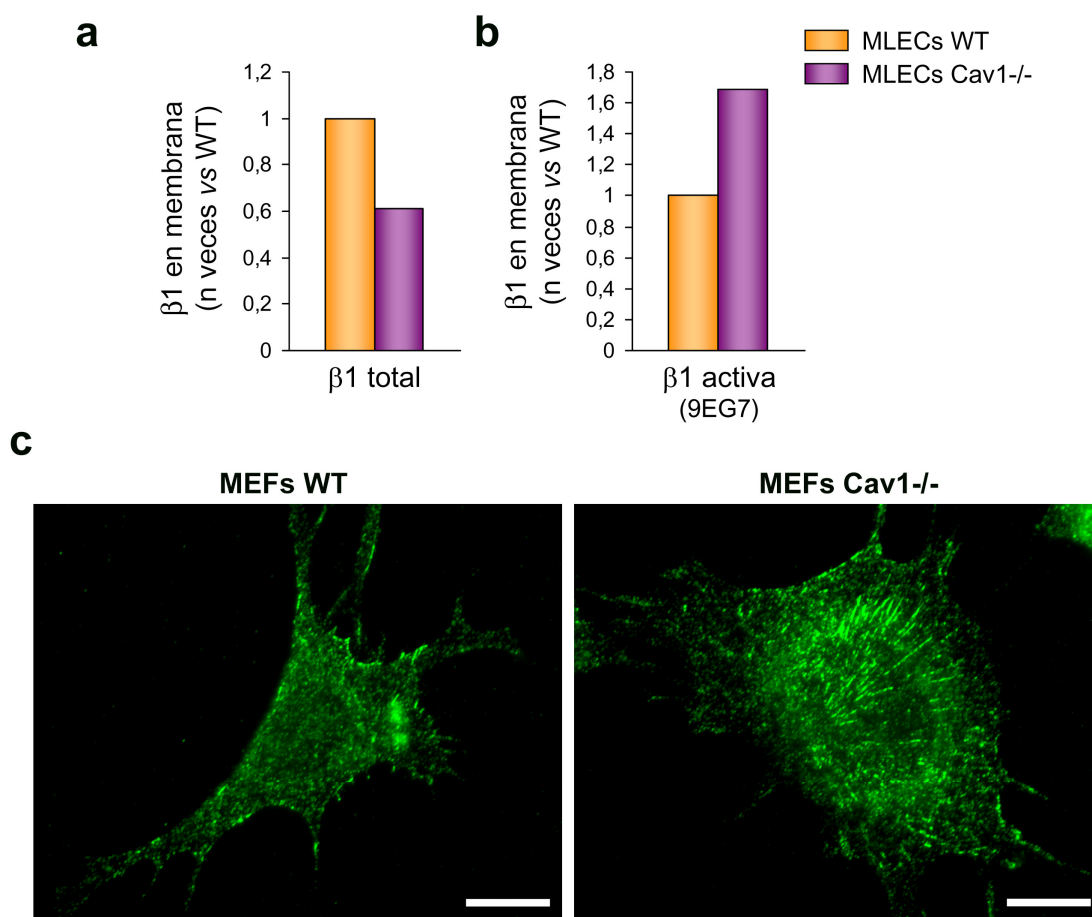
En primer lugar se quiso estudiar la adhesión de la célula a ligandos específicos de las integrinas  $\alpha 5 \beta 1$  y  $\alpha v \beta 3$ , que son de las que más abundantes en fibroblastos. Se observó que los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> presentaban una adhesión ligeramente mayor que los MEFs WT, tanto a FN como a vitronectina (Figura 30 a,b). Adicionalmente, se tuvo constancia de que la adhesión celular se ve afectada por la pérdida total o parcial de Cav1 en otros sistemas celulares, no sólo en fibroblastos. Estos resultados son reproducibles utilizando células endoteliales de pulmón de ratón (MLECs, *mouse lung endothelial cells*) WT y Cav1<sup>-/-</sup> (Figura 30 c) y el mismo resultado se obtiene si bloqueamos la expresión de Cav1 en las células epiteliales humanas HeLa por medio de un RNAi específico para este gen (Figura 33 b).



**Figura 30. Las células deficientes en Cav1 muestran una mayor adhesión a la matriz extracelular.** Se llevaron a cabo ensayos de adhesión con MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> utilizando matrices de FN (5µg/ml) (a) y vitronectina (5µg/ml) (b). Se muestran valores relativos de adhesión celular Cav1<sup>-/-</sup> versus WT. (c) Estos mismos ensayos se repitieron utilizando MLECs sobre matrices de FN. Se representan los niveles de adhesión normalizados a los de las células WT. De cada condición experimental se realizaron 5 ensayos independientes, obteniéndose resultados equiparables.

Una mayor adhesión podría explicarse por una mayor expresión, o bien por una mayor activación de la integrina. Para distinguir entre estas dos posibilidades, los niveles de  $\alpha 5 \beta 1$  en membrana plasmática fueron analizados por citometría de flujo en MEFs y en MLECs. La expresión en superficie de ambas subunidades,  $\alpha 5$  y  $\beta 1$ , estaba disminuida tanto en las MEFs Cav1<sup>-/-</sup> (datos no mostrados) como en las MLECs Cav1<sup>-/-</sup> (Figura 31 a). Se midió también la expresión de  $\alpha v$  y  $\beta 3$ , puesto que también se unen específicamente a FN y vitronectina, pero los niveles de estas integrinas apenas fueron detectables en las MEFs, lo que nos llevó a centrarnos en  $\alpha 5 \beta 1$ .

Esto, en aparente contradicción con los ensayos de adhesión, llevaba a sospechar una posible sobreestimulación de las integrinas por medio de los mecanismos “inside-out” ya comentados. Se analizó entonces el estado de activación de las integrinas  $\alpha 5 \beta 1$  utilizando el anticuerpo 9EG7, que reconoce exclusivamente la conformación de alta afinidad de la subunidad  $\beta 1$ . Como era de esperar, los niveles de  $\beta 1$  activa en membrana resultaron estar incrementados en las MLECs  $\text{Cav1}^{-/-}$  (Figura 31 b) (datos con MEFs aún preliminares). Cuando se utilizó este anticuerpo en ensayos de inmunofluorescencia con MEFs y MLECs WT y  $\text{Cav1}^{-/-}$  adheridos a FN, se comprobó que la integrina  $\beta 1$  activa se concentraba en adhesiones focales, siendo éstas más abundantes y de mayor tamaño en las células deficientes en Cav1, tanto en las MEFs (Figura 31 c) como en las MLECs (Figura 33 a), lo cual concuerda con el hecho de que estas células puedan adherirse con más eficiencia al sustrato en ausencia de Cav1.

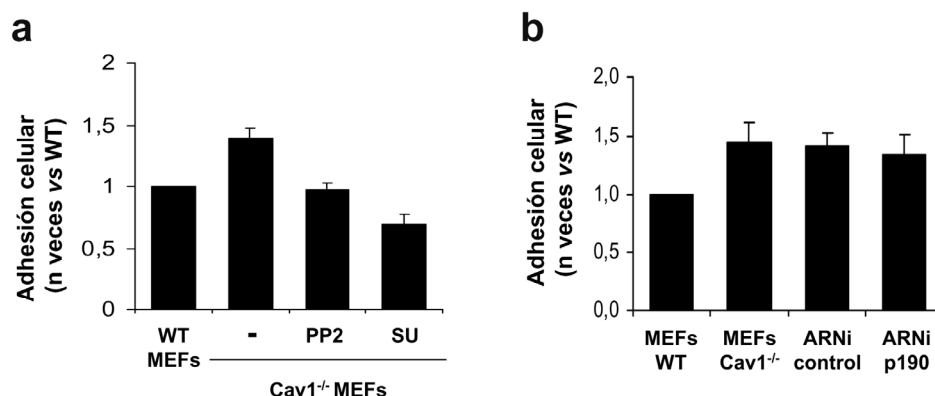


**Figura 31. Las células  $\text{Cav1}^{-/-}$  presentan una mayor expresión en superficie de integrina  $\beta 1$  en conformación activa.** Los niveles de expresión en membrana de integrina  $\beta 1$  total (**a**) y los niveles de  $\beta 1$  en su conformación de alta afinidad (**b**) fueron analizados por citometría de flujo en MLECs WT y  $\text{Cav1}^{-/-}$ . Para ello se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti- $\beta 1$  KMI6 y 9EG7, respectivamente. La gráfica muestra los niveles de integrina en membrana normalizados respecto a los de las células WT. (**c**) MEFs WT y  $\text{Cav1}^{-/-}$  fueron adheridas a matrices de FN y se realizaron inmunofluorescencias con 9EG7 para marcar el patrón de integrina  $\beta 1$  en conformación activa, mostrándose una imagen representativa de cada tipo celular. Barra, 20  $\mu\text{m}$ .



Con el fin de profundizar en los efectos de la pérdida de Cav1 sobre las vías de señales implicadas en la activación “inside-out” de las integrinas, se evaluó la posible contribución de Src al aumento de adhesión de las MEFs Cav1<sup>-/-</sup>, dado que como se ha descrito anteriormente, la ausencia de Cav1 en los fibroblastos lleva a un incremento en la actividad basal de Src. Se repitieron los ensayos de adhesión en presencia de los 2 inhibidores de Src (PP2 y SU6656). Ambos tratamientos llevaron a una recuperación en la adhesión celular, que disminuía hasta los niveles encontrados en los MEFs WT (Figura 32 a). Por tanto la activación de Src contribuye al fenotipo adhesivo de las células deficientes en Cav1.

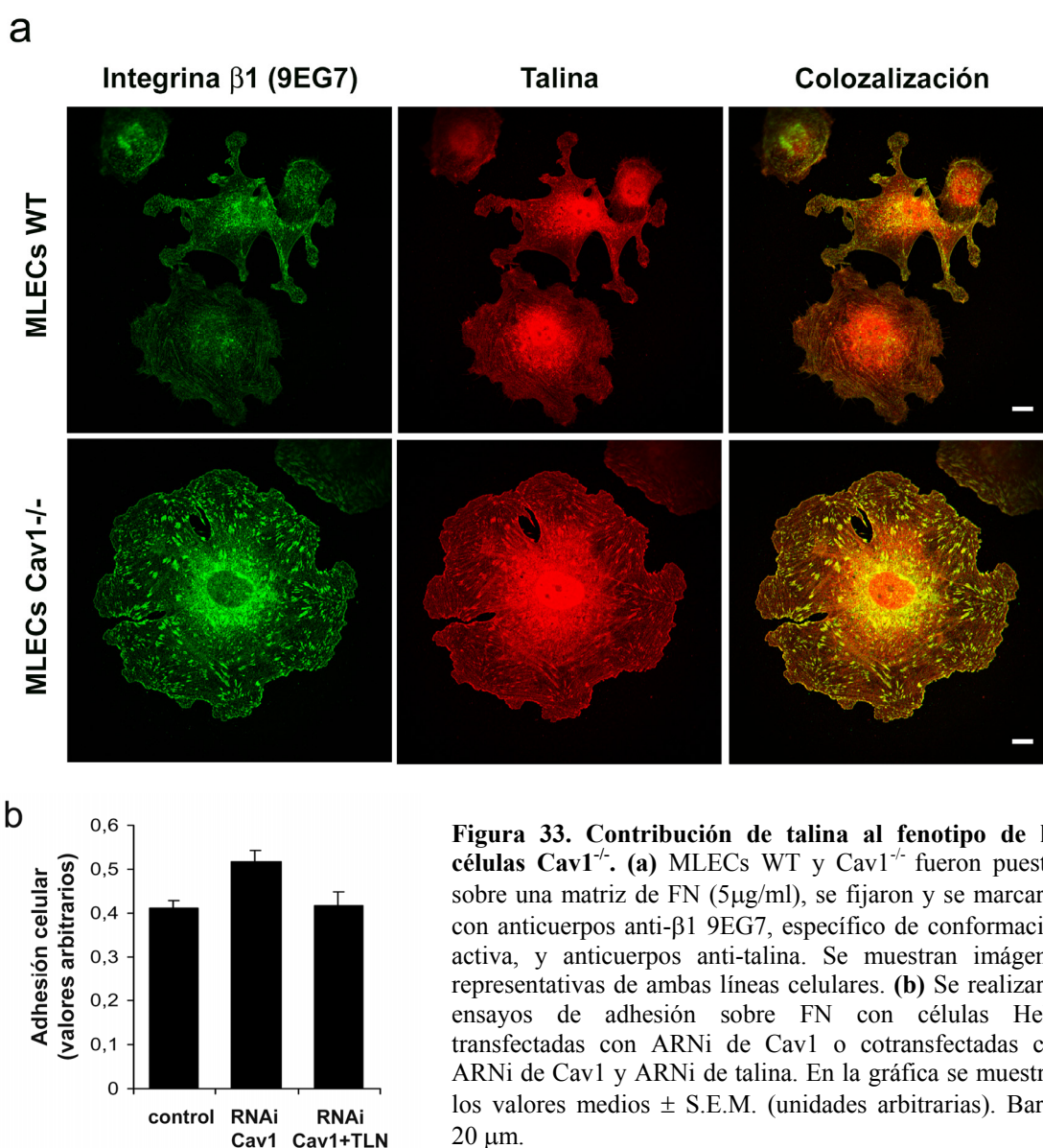
Puesto que la hiperactividad de Src lleva a una activación de p190RhoGAP, y que bloqueando la expresión de este efector se consigue rescatar parte del fenotipo de los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>, se evaluó la implicación de esta vía en el aumento de adhesión. Se observó que los fibroblastos que expresan de forma estable RNAi de p190RhoGAP se adhieren a FN con la misma eficiencia que los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>, al igual que el control transfectado con un RNAi sin diana (Figura 32 b). Estos resultados indican que el aumento de actividad de Src encontrado en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup> es responsable en parte del aumento en la eficiencia con que la célula se adhiere a matrices de FN, pero estaría actuando por vías independientes de p190RhoGAP.



**Figura 32. La inhibición de Src, pero no la de p190RhoGAP, restablece los niveles de adhesión en los MEFs Cav1<sup>-/-</sup>.** (a) Se realizaron ensayos de adhesión con MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup> sobre matrices de FN (5µg/ml), tratando las MEFs Cav1<sup>-/-</sup> con dos inhibidores de Src, PP2 (5µM) y SU6656 (SU) (1µM). (b) Se repitieron los ensayos de adhesión sobre FN con MEFs WT, MEFs Cav1<sup>-/-</sup> y MEFs Cav1<sup>-/-</sup> transfectados de forma estable con RNAi de p190RhoGAP o RNAi control. En las gráficas se representan los niveles de adhesión normalizados a los de las células WT.

Otra proteína importante que influye en el estado de activación de las integrinas es la talina, que se ha descrito como un componente crucial del denominado “complejo activador de integrinas”. Entre los objetivos futuros de este trabajo se encuentra el estudio del posible papel de talina en el aumento de adhesión que ocurre en ausencia de Cav1. Por el momento se han realizado ensayos de adhesión en células HeLa transfectadas con RNAi específicos de Cav1 y

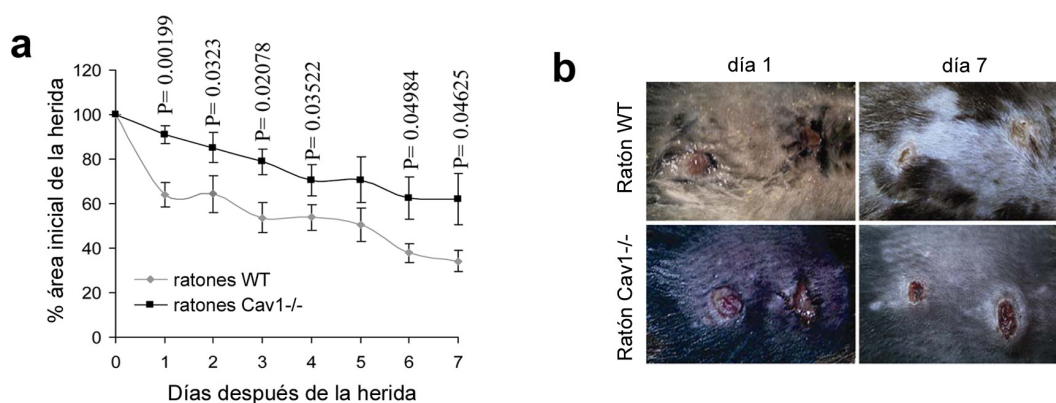
talina, y se observó que el bloqueo de la expresión de talina en células con Cav1 reprimida llevaba a una recuperación de los niveles de adhesión (Figura 33 b). Sería interesante repetir estos ensayos en los fibroblastos de ratón, e indagar sobre el estado de activación de talina en ausencia de Cav1. Como un primer abordaje, se realizaron inmunofluorescencias de talina en los MLECs WT y Cav1<sup>-/-</sup>. En la Figura 33 a se puede apreciar que mientras talina se concentra en estructuras de adhesión que colocalizan con  $\beta 1$  activa en MLECs Cav1<sup>-/-</sup>, en las WT se encuentra más difusa por el citoplasma. Esto, junto con el hecho de que haya más actividad de Src en los fibroblastos deficientes en Cav1, podría indicar que en estas células hay una activación anómala de las integrinas mediada por vías de señalización “inside-out”. Serían necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.





#### 4.6 Los ratones deficientes en Cav1 tienen alterada su capacidad de cicatrización de herida

Para explorar la posibilidad de que las diferencias observadas *in vitro* en el comportamiento migratorio de las células WT y Cav1<sup>-/-</sup> tengan alguna correspondencia *in vivo*, se llevaron a cabo experimentos de reparación de herida en la piel de ratones adultos de 11 semanas de edad WT y deficientes en Cav1. Se efectuaron escisiones de dermis y epidermis de unos 3,5 cm de diámetro en la zona dorsal superior de los animales y se monitorizó diariamente la velocidad de cierre de las heridas. Se encontró que los ratones Cav1<sup>-/-</sup> presentan un sustancial retardo en el proceso de cicatrización (Figura 34 a). En la Figura 34b se muestran imágenes representativas de las heridas WT y Cav1<sup>-/-</sup> a días 1 y 7 después de la ejecución de las escisiones. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un daño importante en la cicatrización de las heridas. No obstante, hay que tener en cuenta que se trata de un proceso muy complejo en el que intervienen factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular, distintos tipos de linajes celulares, y fenómenos de migración direccional, proliferación y diferenciación celular. Esto estaría dificultando la interpretación de nuestros resultados, y sería necesario hacer un examen exhaustivo de cortes histológicos de las heridas a distintos tiempos para poder obtener un dato más concluyente. Pese a todo esto, se ha descrito una mayor tasa proliferativa en las células de los ratones Cav1<sup>-/-</sup> (38, 135), lo que aceleraría *a priori* el cierre de las heridas en estos ratones. Por tanto, el hecho de que, aun así, haya un retraso en la cicatrización estaría apoyando la relevancia de la migración direccional para este proceso en el sistema descrito, estando en consonancia con nuestras observaciones *in vitro* sobre la necesidad de Cav1 para la direccionalidad del movimiento en la célula.



**Figura 34. Los ratones Cav1<sup>-/-</sup> sufren un retardo en el proceso de cicatrización de heridas dérmicas.** Se realizaron dos excisiones de dermis y epidermis por animal en ratones WT y Cav1<sup>-/-</sup> (n=10). **(a)** En la gráfica se hace un seguimiento de la velocidad de cicatrización de las heridas, representando el porcentaje del área inicial de las heridas que va quedando en los días indicados tras la realización de la excisión (medias  $\pm$  S.E.M.). Se indican los valores P de las diferencias estadísticamente significativas. **(b)** Se muestran imágenes representativas de las heridas a día 1 y día 7 desde la realización de las excisiones.



## **5 DISCUSIÓN**



Cav1 es una de las numerosas moléculas de señalización intracelular que han sido implicadas en el complejo proceso de la migración celular. Sin embargo, hay cierta controversia en cuanto a su función reguladora de la motilidad celular, ya que se han descrito tanto efectos positivos (49, 51, 128) como inhibitorios sobre este proceso (56, 203). Esta discrepancia podría ser explicada en algunos casos por cuestiones técnicas o de especificidad del tipo celular utilizado en cada estudio. No obstante, dada la relevancia de la migración celular y de la propia Cav1 en condiciones tanto fisiológicas como patológicas, es importante investigar esta controversia y profundizar en el papel que desempeña Cav1 en el movimiento de las células. En la presente tesis doctoral se han analizado en detalle dos líneas diferentes de fibroblastos prodecente de ratones deficientes en Cav1 (135, 186). Para ello se han llevado a cabo diversos abordajes encaminados a cuantificar la polarización y migración, incluidos estudios del movimiento celular aleatorio y de la migración direccional. Hemos obtenido evidencias del requerimiento de Cav1 para el establecimiento de una morfología celular elongada y polarizada, para el desarrollo de una persistencia direccional intrínseca en el movimiento de la célula, y para una adecuada respuesta migratoria dirigida hacia estímulos externos. En este estudio se demuestra que Cav1 regula la polaridad y la migración direccional modulando los patrones de activación de Src y de las GTPasas de la familia Rho. Los resultados obtenidos sugieren un modelo en el cual la regulación de la actividad de Src por el complejo Cav1/CSK (14, 132) es crucial para el establecimiento de la polaridad celular y la migración dirigida. En las células deficientes en Cav1, la actividad basal de Src está constitutivamente elevada, lo que lleva a una disminución en los niveles de Rho-GTP dependiente de p190RhoGAP, con las consiguientes alteraciones a nivel del citoesqueleto de actina y de las estructuras de adhesión.

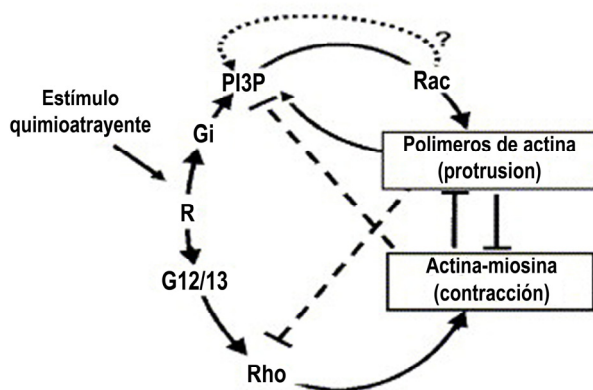
El primer rasgo que se aprecia cuando observamos un fibroblasto Cav1<sup>-/-</sup> es un profundo cambio en su morfología y en la organización del citoesqueleto de actina. La mayoría de estas células son muy redondeadas y sus fibras de estrés tienen una localización periférica, generando en muchos casos anillos corticales de actina. Este fenotipo sugiere alteraciones en la actividad de las GTPasas de la familia Rho, ya que estas proteínas son las principales reguladoras de la polaridad y de los reordenamientos del citoesqueleto (12, 133, 187). De hecho, en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> se detectaron unos niveles de actividad de Rho significativamente disminuidos, y una actividad anormalmente elevada de Rac y Cdc42. Ya se había publicado con anterioridad que el silenciamiento de la expresión de Cav1 mediante RNAi provoca un incremento en los niveles de activación de Rac (56), lo que estaría apoyando este resultado.

Por otro lado, las adhesiones de nueva formación que se generan en las protrusiones celulares tienen una vida media más corta en los fibroblastos deficientes en Cav1, comparado con sus correspondientes controles. Este resultado está de acuerdo con la bajada observada en

los niveles de Rho-GTP, ya que la tasa de reciclaje de las adhesiones presenta una correlación inversa con la actividad de Rho (139). Adicionalmente, los complejos de adhesión son generalmente de menor tamaño y más abundantes en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> comparado con los WT. Este hecho puede ser indicativo de un bloqueo en la maduración de estas estructuras, que también es dependiente de Rho (52, 146). Asimismo, este fenotipo también está apoyado por el aumento en las actividades de Rac y Cdc42, ya que ambas GTPasas están implicadas en la formación de nuevos contactos con el sustrato y promueven el reclutamiento de proteínas del citoesqueleto y de señalización a los complejos focales inmaduros que se generan en las protrusiones celulares (146, 187).

Por otro lado, se ha detectado un aumento en la protrusión celular en los fibroblastos deficientes en Cav1, que además ocurre por todo el perímetro la célula. Es decir, hay más actividad protrusiva, pero ésta no se focaliza espacialmente en un polo de la célula, como ocurre en condiciones normales para permitir una migración dirigida, sino que se produce en varias localizaciones del borde celular, perdiéndose en consecuencia la direccionalidad. Esto está en consonancia con el patrón de actividad de las RhoGTPasas que presentan los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>. De hecho, tanto la inactivación de Rho (2) como la activación de Rac promueven la protrusión de membrana (93, 133), habiendo además un efecto mutuo antagónico entre las dos GTPasas (12, 110, 146, 147). Pese a dicho antagonismo, y aunque modelos anteriores habían postulado que Rac es la principal promotora de las protrusiones de membrana, mientras que la acción de Rho se centra más en la regulación de la contractilidad celular, se han obtenido evidencias también de un papel de Rho en la regulación de las protrusiones y formación de *ruffles*. Mediante la técnica de FRET, se ha detectado recientemente una alta actividad de Rho en una estrecha región inmediatamente adyacente al frente de avance de células migrando, tanto con movimiento aleatorio en ausencia de gradientes quimiotácticos, como en migración dirigida en ensayos de cierre de herida (76, 126). Sin embargo, el patrón de señalización de Rho en protrusiones puede variar en función del estímulo extracelular; así, en las protrusiones de membrana inducidas por PDGF la actividad de Rho es baja (126). Kurokawa y colaboradores han propuesto que Rho puede estar cooperando con Rac y Cdc42 en la formación de *ruffles* mediante el reclutamiento de mDia (76). Esta proteína está implicada tanto en la estabilización y orientación de microtúbulos en el frente de avance, como en la polimerización de actina necesaria para la formación de protrusiones (118). Estos datos sugieren que Rho es requerido para la emisión de protrusiones en el frente de avance así como para una migración direccional eficiente, no solamente para la contracción celular, como se había establecido previamente. La baja actividad de Rho de los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>, junto con la pérdida de direccionalidad de estas células está en concordancia con estos trabajos.

Resulta sorprendente que cada uno de los mutantes de las RhoGTPasas (mutante activo de Rho y los dominantes negativos de Rac/Cdc42) pueda rescatar de forma individual el fenotipo polarizado normal cuando se transfectan en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>. El hecho de que en estas células esté alterado el patrón de activación de las tres GTPasas complica la interpretación de este resultado. Una posible explicación podría basarse en la inhibición mutua que existe entre el polo anterior y el polo posterior de la célula, concretamente entre las vías que dependen de Rac/Cdc42 y las dependientes de Rho (85, 95, 108, 197). Como ejemplo de este balance, se ha descrito un modelo de establecimiento de polaridad en neutrófilos basado en el antagonismo de vías de señalización que tiene lugar entre el frente de avance y el polo de retracción de la célula. Cuando estímulos quimioatrayentes se unen a receptores de membrana (acoplados a proteínas G), se activan diferentes proteínas G heterotriméricas, lo que genera dos respuestas divergentes y opuestas, que promueven el establecimiento de un polo anterior y otro posterior, respectivamente. En el polo anterior, la proteína Gi, PI3P y Rac promueven la formación de polímeros de actina. Se dan también ciclos de retroalimentación positiva, en los que Rac y Cdc42 pueden incrementar la acumulación local de PI3P y aumentar la respuesta al quimioatrayente. Mientras, las señales del polo posterior, generadas por las proteínas G12 y G13, dependen de la activación de Rho, que lleva a la activación de miosina II, a la formación de filamentos contráctiles de actina-miosina, y a la inhibición de las vías dependientes de Rac y PI3P. Las señales del polo posterior inhibirían la señalización del polo anterior, y viceversa (Figura 35) (197).



**Figura 35. Antagonismo entre las vías de señalización que se desarrollan en polos opuestos de la célula.** Un estímulo quimioatrayente se une a receptores acoplados a proteínas G (R). Los receptores acoplados a Gi activan vías de señalización en el frente de la célula, que implican PI3P, Rac y la estimulación de la polimerización de actina. Mientras, los receptores acoplados a G12/13 activan cascadas de señalización en el polo posterior de la célula, donde participan Rho y miosina, y estimulan la contractilidad celular. Las vías del frente de avance de la célula están sujetas a ciclos de retroalimentación positiva, por el propio proceso de polimerización de actina (flecha continua desde polímeros de actina a PI3P) y posiblemente por Rac (flecha discontinua desde Rac a PI3P). Por otro lado se da una mutua inhibición entre la señalización del polo posterior de la célula y la del polo anterior (líneas discontinuas acabadas en barra).

Por tanto, el rescate de la morfología celular WT por cada mutante no implica necesariamente que las alteraciones en la carga de GTP de cada RhoGTPasa jueguen un papel directo en el fenotipo observado en las células deficientes en Cav1, sino que pueden darse efectos indirectos por compensación entre las distintas rutas que regulan las GTPasas. En el caso de Rac, aparte un aumento en la carga de GTP, se ha detectado un mayor reclutamiento de Rac a la membrana plasmática de las células deficientes en Cav1, lo cual puede estar contribuyendo al fenotipo observado. En cualquier caso, probablemente sea el desequilibrio del balance que existe entre las distintas RhoGTPasas lo que esté llevando a las células Cav1<sup>-/-</sup> a tener una morfología aberrante y un comportamiento migratorio anómalo.

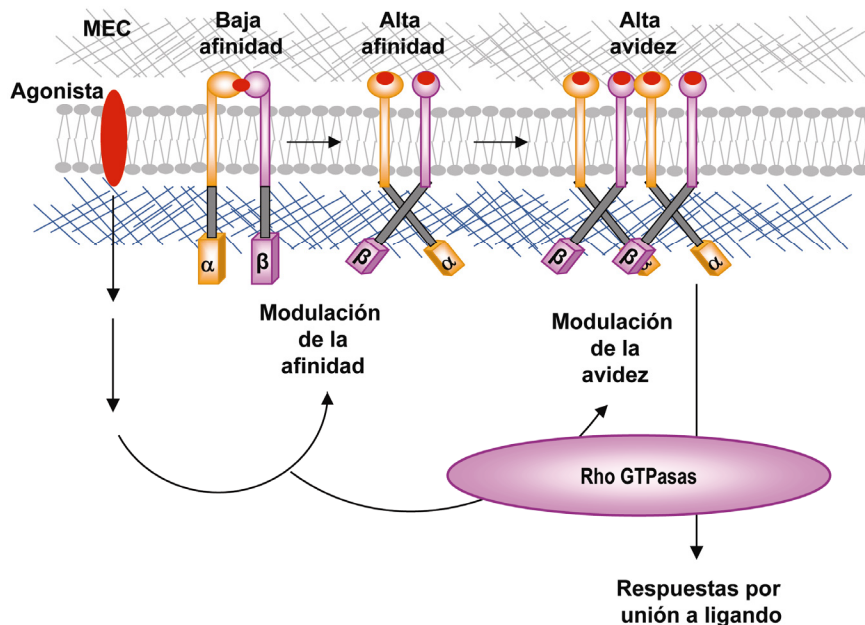
En concordancia con las alteraciones morfológicas y de polaridad celular, los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> muestran un profundo defecto en la migración direccional, tanto en la dirigida frente a un estímulo externo como en la direccionalidad intrínseca que las células WT presentan en desplazamientos aleatorios. Pankov y colaboradores han mostrado que Rac juega un papel crítico en el desarrollo de la persistencia direccional, es decir, el sentido intrínseco de direccionalidad que posee la célula. Una alta actividad de Rac promueve la formación de lamelas periféricas en todo el perímetro celular, que resulta en un patrón de migración errático con frecuentes cambios en la dirección de desplazamiento. Por el contrario, un descenso en la actividad de Rac favorece el establecimiento de una lamela dominante en un polo de la célula, y por tanto, que la célula pase a tener una migración con más persistencia direccional (121). De acuerdo con esto, los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>, que presentan unos niveles de Rac-GTP incrementados, muestran un patrón de migración aleatorio, con bajo índice de direccionalidad. Por otro lado, en estas células hay un mayor reclutamiento de Rac en toda la extensión de la membrana plasmática, incluso en ausencia de estímulos externos, que junto con los altos niveles de Rac-GTP, podrían estar impidiendo el establecimiento de una lamela dominante que determine un único frente de avance, lo que llevaría a la pérdida de direccionalidad en el desplazamiento. De hecho, los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup> tienen una elevada actividad protrusiva, con emisión de lamelas por todo su perímetro celular. Confirmando estos datos, hemos detectado en ensayos de cierre de herida *in vitro* que, en efecto, las células deficientes en Cav1 durante su migración presentan en general dos o más lamellas periféricas, en polos opuestos de la célula, con alta concentración de Rac en cada una de ellas.

Aunque la ausencia de Cav1 conlleve un defecto en la direccionalidad, la capacidad migratoria no se pierde, puesto que la velocidad de migración en ausencia de estímulos quimiotácticos es incluso ligeramente superior en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>, comparado con sus controles. De hecho, se ha descrito previamente que un aumento considerable en la actividad de Rac puede promover una mayor velocidad de migración, lo que apoya el fenotipo observado en



las células Cav1<sup>-/-</sup> (121). Esto concuerda con aquellos trabajos donde se sugiere que la expresión de Cav1 podría estar inhibiendo la migración celular (56, 62, 203). Por tanto, los resultados aparentemente contradictorios detectados en la bibliografía en cuanto al papel de Cav1 en migración podrían reconciliarse mediante un análisis detallado de la migración aleatoria *versus* migración direccional. En otros casos la divergencia de resultados podría deberse a una cuestión de especificidad de línea celular, o a cuestiones técnicas. Por ejemplo, Hassan y colaboradores muestran que las células vasculares de músculo liso deficientes en Cav1 son ligeramente más migratorias que las células control (62). Sin embargo, estas células expresan Cav3, que podría compensar la falta de Cav1. Y por otro lado, las células de este estudio fueron aisladas de un modelo animal “doble *knockout*” deficiente en Ink4a y Cav1 (62). Este factor genotípico podría estar afectando notablemente a los resultados obtenidos.

Se comprobó que las alteraciones de fenotipo detectadas en las células deficientes en Cav1 son dependientes de Cav1, ya que recuperando la expresión de este gen en estas células se consigue rescatar el fenotipo WT a varios niveles (polarización, migración direccional, niveles de Rho-GTP, tasa de reciclaje de adhesiones focales, etc). Es importante indicar que las células deficientes en Cav1 estudiadas en este trabajo carecen también de Cav3, por estar restringida su expresión a células musculares, mientras que Cav2 en ausencia de Cav1 es retenida en el aparato de Golgi y acaba siendo degradada (104, 123). Por tanto, el rescate por parte de Cav1 resalta la importancia de esta proteína en estas funciones de la célula. La recuperación del fenotipo WT es además dependiente de la fosforilación de Cav1 en Y14, que es sustrato de Src, así como de otras tirorina quinasas (55). Se ha observado que, a su vez, esta fosforilación puede ser importante para la regulación de la actividad de Src, ya que pY14-Cav1 puede unir y activar CSK, la cual a su vez fosforila e inactiva Src, cerrando un ciclo de retroalimentación negativo (14, 132). Basándonos en estos hechos sería esperable que, en ausencia de pY14-Cav1, estuviese bloqueada la inhibición de Src por CSK (Figura 37). De acuerdo con esta hipótesis, hemos encontrado una actividad basal de Src elevada en los fibroblastos Cav1<sup>-/-</sup>, y cuando estas células son reconstituidas con un mutante de Cav1 no fosforilable por Src (Cav1-Y14F), no se consigue revertir el fenotipo. En las células Cav1<sup>-/-</sup> el aumento en la activación de Src va acompañado de un descenso en los niveles de esta proteína, lo que concuerda con trabajos anteriores donde ven que Src activada por fosforilación en Y418 sufre una mayor tasa de degradación proteolítica dependiente del proteosoma, debido a una mayor poliubiquitinación (59). A pesar de este descenso en la cantidad de proteína, el aumento en la activación de Src tiene gran relevancia funcional, ya que la inhibición farmacológica de Src en las células deficientes en Cav1 es capaz de recuperar el fenotipo WT. En futuras investigaciones sería interesante analizar con detalle el papel de CSK en esta vía de señales.



**Figura 36. Regulación de las integrinas por las GTPasas de la familia Rho.** En células sin estimular, las integrinas están frecuentemente en un estado de baja afinidad y baja avididad por los ligandos (entramado gris) de la matriz extracelular (MEC). Los estímulos agonistas (factores de crecimiento, citoquinas, etc.), cooperando con diversidad de receptores de membrana, pueden inducir una señalización intracelular que lleve a un incremento en la afinidad y avididad de las integrinas por sus ligandos. Se piensa que la modulación de la afinidad se lleva a cabo por interacción de proteínas reguladoras a las colas citoplasmáticas de las integrinas, implicando posiblemente a proteínas del citoesqueleto (entramado azul). Como se muestra en el esquema, estas interacciones pueden afectar a la conformación y orientación de las integrinas, de manera que quedan más expuestos los dominios de unión a los ligandos de la MEC. La regulación de la avididad, que implica una movilización lateral de las integrinas por la membrana y su agrupación formando oligómeros, puede ser controlada por las RhoGTPasas, e implica la regulación de interacciones de las colas de las integrinas con el citoesqueleto de actina. La activación de integrinas desencadena diferentes respuestas como la extensión o *spreading* de las células, que están claramente bajo el control de las GTPasas.

Las células deficientes en Cav1 presentan también un defecto a nivel de las integrinas. Al menos para el caso de la integrina  $\beta 1$ , se ha detectado un descenso en los niveles de estos receptores en la membrana plasmática, pero acompañado de un incremento notable en su activación por un aumento en su afinidad por el ligando. El hecho de que estas células dispongan de más integrinas  $\beta 1$  en conformación activa conlleva un incremento en la fuerza de adhesión de la célula a la matriz extracelular de fibronectina. También presentan mayor adhesión a vitronectina, por lo que probablemente haya otras integrinas afectadas, que sería interesante estudiar en un futuro. Es probable que los niveles alterados de las GTPasas detectados en ausencia de Cav1 lleven a una activación de las integrinas por señalización *inside-out*. Sin embargo, no se han descrito hasta el momento mecanismos por los cuales las RhoGTPasas modulen directa o indirectamente la afinidad de las integrinas por su ligando por inducción de cambios conformacionales en el receptor. Sí se ha propuesto que las RhoGTPasas

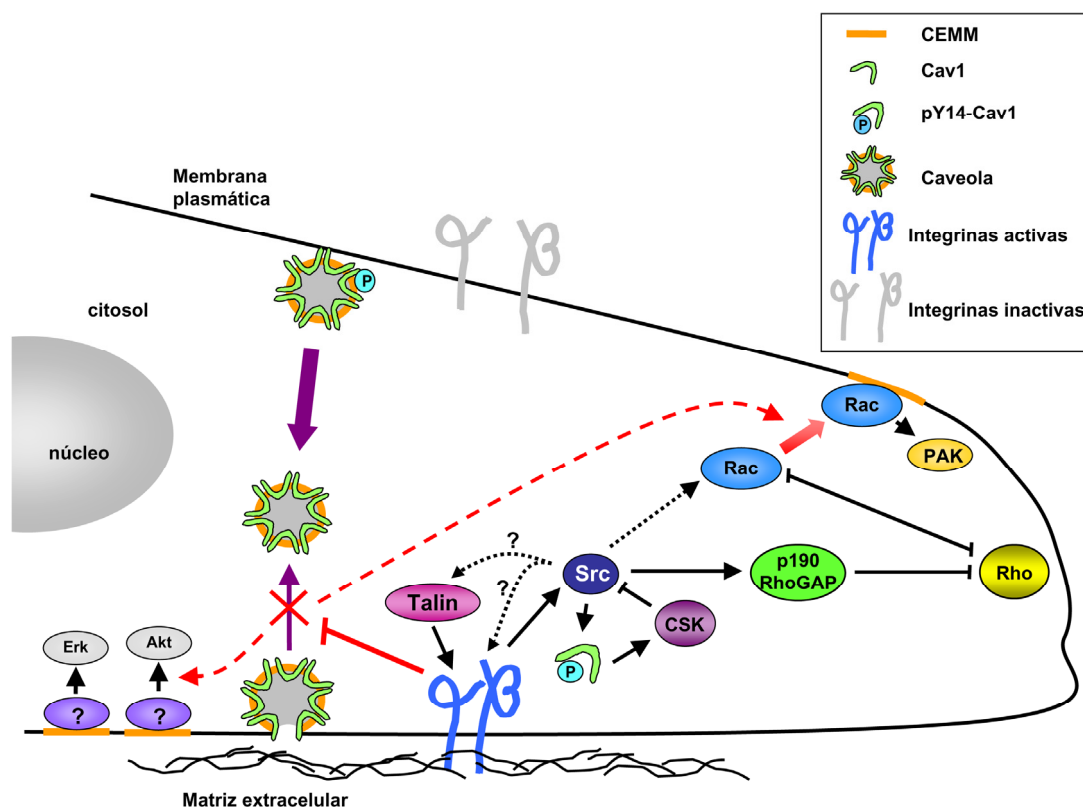
pueden influir sobre la actividad de la integrina modulando su afección por el ligando, o lo que es lo mismo, promoviendo la translocación de las integrinas por la membrana y su agregación en *clusters* (Figura 36) (158). La agregación de integrinas en complejos focales es dependiente de Cdc42 y Rac, mientras que la agregación de integrinas en adhesiones focales depende de Rho (111, 146). En general, las RhoGTPasas están más relacionadas con la función de las integrinas en cuanto a su implicación en la señalización intracelular que tiene lugar tras la interacción de la integrina con su ligando (señalización “*outside-in*”) (158). En cualquier caso, apoyando la hipótesis de la activación de las integrinas por señalización *inside-out* en ausencia de Cav1, hemos detectado una fuerte colocalización de talina con integrina en las adhesiones que contienen  $\beta 1$  en conformación activa en las células deficientes en Cav1. En estas células, ambas proteínas se organizan en *clusters* o estructuras de adhesión de mayor tamaño que en las células control. Talina constituye un nexo entre las integrinas y el citoesqueleto, y es uno de los elementos finales en la cascada de señalización que controla la activación de estos receptores. Esta proteína puede unirse a la cola citoplasmática de la subunidad  $\beta$  de las integrinas, lo que provoca ajustes conformacionales en los dominios extracelulares de la integrina que aumentan su afinidad por el ligando (13, 178). Datos preliminares del presente trabajo indican que talina puede estar teniendo algún papel en el fenotipo de las células deficientes en Cav1, ya que su inhibición con ARNi restablece los niveles de adhesión celular, lo cual puede ser indicativo de una bajada en la afinidad de las integrinas por el sustrato. En un futuro, sería interesante indagar sobre el estado de activación de talina en las células Cav1<sup>-/-</sup> y estudiar las conexiones entre caveolina y talina. Un posible nexo es la quinasa Src, dado que su inhibición también lleva a una recuperación en la fuerza adhesiva de las células Cav1<sup>-/-</sup>. Sin embargo, Src se ha relacionado más con la señalización *outside-in* de las integrinas. Por tanto, el mecanismo por el que podría estar promoviendo la activación de las integrinas en nuestro sistema no está claro. De hecho, diversos trabajos sugieren que Src regula negativamente la afinidad de las integrinas por su ligando (87, 178). Sin embargo, su papel regulador podría depender de la integrina o el tipo celular estudiado, ya que se ha descrito que Src puede promover una alta afinidad de  $\alpha 4\beta 1$  por su ligando VCAM-1 en linfocitos (43).

Se ha hallado que las alteraciones encontradas en las vías de señalización de Src y de las RhoGTPasas son responsables de los defectos en polarización y en el comportamiento migratorio de las células deficientes en Cav1. Basándonos en trabajos anteriores y en los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral podemos proponer un modelo en el cual Cav1 puede influir sobre la señalización de las RhoGTPasas a través de al menos dos mecanismos diferentes que implican de una manera u otra a las integrinas. Por un lado, la pY14-Cav1 regula la endocitosis de las caveolas, y por otro lado, interviene en numerosas cascadas de transducción de señales asociadas a las integrinas. La unión de las integrinas a proteínas de la matriz

extracelular produce un bloqueo en la endocitosis de los CEMMs a través de caveolas (40). La retención de estos dominios de membrana ricos en colesterol en la superficie celular permite la interacción de muchas moléculas de señalización intermediarias con sus correspondientes proteínas efectoras. La activación de PAK mediada por Rac depende de estos subdominios de membrana, al igual que otras vías, por ejemplo las que implican a Erk y Akt (29, 32). En las células deficientes en Cav1, los CEMMs permanecen en la membrana plasmática independientemente de la regulación por integrinas. De hecho, en células Cav1<sup>-/-</sup> despegadas del sustrato, al no poder internalizarse estos microdominios, Rac puede mantenerse anclado a la membrana y activar rutas de señalización que en condiciones normales se apagan cuando las células se encuentran en suspensión. La activación de integrinas juega también un papel más directo en la regulación de multitud de cascadas de señalización. Las integrinas, cuya afinidad por la matriz extracelular está elevada en ausencia de Cav1 por un mecanismo que todavía no hemos esclarecido totalmente, pueden activar Src, que a su vez promueve la activación de Rac y Cdc42 a través de numerosas vías. Por ejemplo, puede activar Rac a través una ruta que implica a las proteínas p130cas, Crk, ELMO y Dock180, ésta última con actividad GEF para Rac (34, 74, 189). También pueden fosforilarse y activarse los GEFs de Rac Tiam1 y Vav2 (159), y FRG, que a través de Cdc42 y Vav2 promueve también la activación de Rac (72). En cuanto a Cdc42, muchas vías de activación por integrinas y Src serían comunes a las de Rac, a través de proteínas como FRG y Vav2 (101, 184); o también mediante una ruta que implica Crk/C3G/Rap1 (46). Por otro lado, la activación de Src puede llevar a la inhibición de la GTPasa Rho a través de p190RhoGAP (3, 9, 97). En este trabajo se muestran evidencias de la implicación de p190RhoGAP en la pérdida de polaridad y migración dirigida que se da ante la ausencia de Cav1. Caveolina puede ejercer funciones independientes de las caveolas e intervenir directamente en estas rutas de señales (90). Como se ha comentado previamente, pY14-Cav1 puede inhibir Src a través de CSK, de modo que en ausencia de Cav1 se detecta una hiperactividad de Src, que a su vez activaría p190RhoGAP, lo que lleva a una bajada en los niveles de Rho-GTP (Figura 37). En condiciones normales, la vía Src/p190RhoGAP es responsable de la bajada transitoria en los niveles de Rho-GTP que tiene lugar tras la activación de integrinas, a tiempos cortos de adhesión. En ausencia de Cav1, esta bajada se perpetúa en el tiempo al encontrarse hiperactivada esta vía.

Es importante destacar que, a parte de la regulación por fosforilación, se ha descrito que para la actividad de p190RhoGAP es crucial su correcta translocación a la membrana plasmática, concretamente a los CEMMs, para lo que se requiere su interacción con p120RasGAP (8, 94). Esta interacción puede depender de Src y de otras quinasas como Arg (8, 63, 145). El hecho de que las células Cav1<sup>-/-</sup> tengan retenidos estos microdominios de membrana en superficie, junto con la mayor actividad de Src y la mayor expresión de p190RhoGAP,

podría estar contribuyendo a mantener hiperactivada la vía de p190RhoGAP. Por tanto, sería interesante cuantificar el fraccionamiento (membrana vs citosol) de p190RhoGAP en las células Cav1<sup>-/-</sup>, y específicamente analizar los niveles de fosforilación de esta proteína en la fracción de membrana, donde podría estar concentrada la actividad de p190RhoGAP (8, 94).



**Figura 37. PY14-Cav1 regula los procesos de polarización celular y migración direccional a través de al menos dos mecanismos diferentes.** PY14-Cav1 está implicada por un lado en la endocitosis de caveolas, y por otro, en la transducción de señales asociadas a las integrinas. La unión de las integrinas a la matriz extracelular bloquea la internalización de los CEMMs, que es mediada por la endocitosis de las caveolas. La retención de estos microdominios de membrana en la superficie celular permite la interacción de muchas proteínas intermediarias con sus efectores. La activación de PAK mediada por Rac depende de estos CEMMs, al igual que muchas otras rutas, por ejemplo las que implican a Erk y Akt (32). La activación de integrinas también juega un papel más directo en la regulación de numerosas vías de señalización. Las integrinas activan Src, que a su vez promueve la activación de Rac por medio de múltiples vías, e inhibe Rho a través de p190RhoGAP. Cav1, a su vez, es sustrato de Src, ejerciendo al mismo tiempo un efecto negativo sobre la activación de Src. PY14-Cav1 puede unir y activar CSK, el cual inhibe Src por fosforilación, cerrando un ciclo de retroalimentación negativo. En resumen, pY14-Cav1 modula, por un lado, la carga de GTP de Rho/Rac por participación directa en las vías de señalización que activan estas GTPasas, y por otro lado, regula indirectamente la translocación de Rac a la membrana, por medio de la endocitosis de los CEMMs.

En resumen, pY14-Cav1 puede regular la actividad de las RhoGTPasas por medio de dos mecanismos muy diferentes: [1] Participando directamente en las vías de señalización que regulan la carga de GTP de estas proteínas; [2] modulando indirectamente el reclutamiento de

las GTPasas a la membrana plasmática, y por tanto, su interacción con las proteínas efectoras, por medio de la regulación de la internalización de los CEMMs (Figura 37).

En los diversos modelos animales deficientes en Cav1 que se han generado, se observa que la ausencia de esta proteína lleva a la desregulación de múltiples vías de señalización, que en consecuencia dan lugar a un amplio rango de alteraciones fenotípicas (79, 137). Parte de estos fenotipos observados podrían estar asociados a los defectos migratorios *in vitro* e *in vivo* recopilados en este trabajo. Por ejemplo, los ratones Cav1<sup>-/-</sup> presentan una alteración en su respuesta angiogénica ante estímulos externos (171, 196). La angiogénesis es un proceso complejo que implica fenómenos tanto de migración como de proliferación de las células endoteliales, y estudiar la contribución de cada uno de ellos es complicado. Sin embargo, pese a la mayor tasa proliferativa detectada en las células Cav1<sup>-/-</sup>, se ha observado una reducción en la invasión celular y formación de vasos sanguíneos en matriges implantados en ratones Cav1<sup>-/-</sup> (196). Esto indicaría que los defectos angiogénicos *in vivo* son probablemente una consecuencia de las alteraciones en la migración de las células endoteliales. En apoyo a esta idea, se ha descrito en estudios *in vitro* que la supresión de la expresión de Cav1 lleva a una quimiotaxis alterada en células endoteliales (49).

Otro proceso en el cual la migración juega un papel crucial es la regeneración tisular. En el presente trabajo se ha detectado una alteración en el proceso de cicatrización de herida en piel en los ratones deficientes en Cav1. Este proceso depende de una gran variedad de tipos celulares (queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, células inmuno-competentes, etc), y de multitud de funciones celulares, incluidas la migración direccional, la proliferación celular y la diferenciación de células mesenquimales y células epiteliales (165). La migración direccional parece jugar también un papel decisivo en este proceso, ya que se encuentra alterado a pesar de que la ausencia de Cav1 lleva a una aceleración en el ciclo celular, lo cual podría favorecer, en principio, el cierre de herida (38, 135). Es importante señalar que, aunque los ratones Cav1<sup>-/-</sup> sufran un retardo significativo en la cicatrización, al final son capaces de cerrar completamente las heridas de la piel. De forma análoga, en los ensayos *in vitro* las heridas acaban cerrándose, y además las diferencias entre las células WT y las Cav1<sup>-/-</sup> se suavizan a tiempos largos de cierre de herida, posiblemente por la mayor velocidad aleatoria de las células Cav1<sup>-/-</sup> y su mayor tasa de proliferación.

A pesar de todas estas alteraciones descritas, los ratones Cav1<sup>-/-</sup> son viables, lo que sugiere que Cav1 es dispensable para un desarrollo embrionario normal (38, 135). Aunque no se ha analizado en detalle el desarrollo embrionario de estos animales, dada la intrincada red de cascadas de señalización y mecanismos de regulación que están implicados en la migración celular (142, 187), es probable que la falta de Cav1 esté siendo compensada por otras vías de

señales. En futuras investigaciones sería interesante profundizar en las vías y mecanismos subyacentes a las distintas alteraciones fenotípicas que muestran los ratones Cav1<sup>-/-</sup>.





## **6 CONCLUSIONES**



1. Caveolina-1 desempeña un papel fundamental en la adquisición de una morfología alargada y polarizada en la célula, participando en los reordenamientos del citoesqueleto y en la dinámica de las estructuras de adhesión de la célula con la matriz extracelular.
2. La pérdida de la expresión de caveolina-1 conlleva alteraciones en la actividad de las GTPasas de la familia Rho (disminución en los niveles de RhoA-GTP y aumento de los de Rac1-GTP y Cdc42-GTP), principales reguladoras de la maquinaria de polarización y migración celular. En las células deficientes en caveolina-1 hay además una mayor translocación de Rac1 a la membrana plasmática, que se correlaciona con un aumento en la actividad protrusiva de la membrana.
3. Caveolina-1 actúa como un regulador positivo en procesos de migración direccional, estando afectados en su ausencia tanto la persistencia direccional intrínseca de las células en migración aleatoria, como la direccionalidad en respuesta a estímulos externos. Los defectos de migración *in vitro* en ausencia de caveolina-1 se correlacionan con un retardo en la velocidad de cicatrización de heridas dérmicas en ratones deficientes en esta proteína.
4. Caveolina-1 promueve la polaridad celular y la migración direccional modulando los patrones de activación de la quinasa Src y de las Rho GTPasas. Caveolina-1 controla los niveles normales de activación de RhoA a través de la inactivación de la ruta Src/p190RhoGAP. Por otro lado, a parte de participar directamente en las vías de señalización que regulan la actividad de las GTPasas, caveolina-1 puede modular indirectamente la interacción de estas proteínas con sus efectores regulando la endocitosis de las caveolas.
5. Por medio de un mecanismo aun desconocido, caveolina-1 puede influir sobre el estado de afinidad de las integrinas por sus ligandos, regulando de esta forma la fuerza de la adhesión celular al substrato. Datos preliminares indican que la quinasa Src y la proteína talina, un componente del denominado “complejo de activación de integrinas”, pueden estar contribuyendo al aumento en la adhesión celular observada en las células deficientes en caveolina-1.



## **7 BIBLIOGRAFÍA**



1. Arroyo, A. G., A. Garcia-Pardo, and F. Sanchez-Madrid. 1993. A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti-beta 1 chain monoclonal antibody. *J Biol Chem* 268:9863-8.
2. Arthur, W. T., and K. Burridge. 2001. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell* 12:2711-20.
3. Arthur, W. T., L. A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* 10:719-22.
4. Bar-Sagi, D., and A. Hall. 2000. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103:227-38.
5. Beardsley, A., K. Fang, H. Mertz, V. Castranova, S. Friend, and J. Liu. 2005. Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem* 280:3541-7.
6. Bernards, A., and J. Settleman. 2004. GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* 14:377-85.
7. Bleijs, D. A., G. C. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, J. P. Thijssen, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2001. A single amino acid in the cytoplasmic domain of the beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 regulates avidity-dependent inside-out signaling. *J Biol Chem* 276:10338-46.
8. Bradley, W. D., S. E. Hernandez, J. Settleman, and A. J. Koleske. 2006. Integrin signaling through Arg activates p190RhoGAP by promoting its binding to p120RasGAP and recruitment to the membrane. *Mol Biol Cell* 17:4827-36.
9. Brouns, M. R., S. F. Matheson, and J. Settleman. 2001. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol* 3:361-7.
10. Brown, D. A., and E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275:17221-4.
11. Brugnera, E., L. Haney, C. Grimsley, M. Lu, S. F. Walk, A. C. Tosello-Tramont, I. G. Macara, H. Madhani, G. R. Fink, and K. S. Ravichandran. 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4:574-82.
12. Burridge, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116:167-79.
13. Calderwood, D. A. 2004. Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* 32:434-7.
14. Cao, H., W. E. Courchesne, and C. C. Mastick. 2002. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a Role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: Recruitment of C- terminal Src kinase. *J Biol Chem* 277:22222-22232.
15. Capozza, F., T. M. Williams, W. Schubert, S. McClain, B. Bouzahzah, F. Sotgia, and M. P. Lisanti. 2003. Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol* 162:2029-39.
16. Carlier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 136:1307-22.

17. Carman, C. V., and T. A. Springer. 2003. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* 15:547-56.
18. Carragher, N. O., and M. C. Frame. 2004. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 14:241-9.
19. Cary, L. A., D. C. Han, T. R. Polte, S. K. Hanks, and J. L. Guan. 1998. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase- promoted cell migration. *J Cell Biol* 140:211-21.
20. Cheng, Z. J., R. D. Singh, D. K. Sharma, E. L. Holicky, K. Hanada, D. L. Marks, and R. E. Pagano. 2006. Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol Biol Cell* 17:3197-210.
21. Cichowski, K., J. S. Brugge, and L. F. Brass. 1996. Thrombin receptor activation and integrin engagement stimulate tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product, p95vav, in platelets. *J Biol Chem* 271:7544-50.
22. Clark, E. A., W. G. King, J. S. Brugge, M. Symons, and R. O. Hynes. 1998. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J. Cell Biol.* 142:573-86.
23. Clark, K., R. Pankov, M. A. Travis, J. A. Askari, A. P. Mould, S. E. Craig, P. Newham, K. M. Yamada, and M. J. Humphries. 2005. A specific alpha5beta1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J Cell Sci* 118:291-300.
24. Cote, J. F., and K. Vuori. 2002. Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* 115:4901-13.
25. Couet, J., M. Sargiacomo, and M. P. Lisanti. 1997. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 272:30429-38.
26. Danen, E. H., P. Sonneveld, C. Brakebusch, R. Fassler, and A. Sonnenberg. 2002. The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* 159:1071-86.
27. Das, K., R. Y. Lewis, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1999. The membrane-spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J Biol Chem* 274:18721-8.
28. Dawe, H. R., L. S. Minamide, J. R. Bamburg, and L. P. Cramer. 2003. ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr Biol* 13:252-7.
29. del Pozo, M. A., N. B. Alderson, W. B. Kiosses, H. H. Chiang, R. G. Anderson, and M. A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* 303:839-42.
30. del Pozo, M. A., W. B. Kiosses, N. Alderson, N. Meller, K. M. Hahn, and M. A. Schwartz. 2002. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of RhoGDI. *Nature Cell Biol.* 4:232-239.



31. del Pozo, M. A., L. S. Price, N. B. Alderson, X. D. Ren, and M. A. Schwartz. 2000. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *Embo J* 19:2008-2014.
32. Del Pozo, M. A., and M. A. Schwartz. 2007. Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol* 17:246-50.
33. del Pozo, M. A., M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, J. M. Serrador, and F. Sánchez-Madrid. 1999. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29:3609-20.
34. DeMali, K. A., K. Wennerberg, and K. Burridge. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 15:572-82.
35. Dharmawardhane, S., L. C. Sanders, S. S. Martin, R. H. Daniels, and G. M. Bokoch. 1997. Localization of p21-Activated Kinase 1 (PAK1) to pinocytic vesicles and cortical actin structures in stimulated cells. *J. Cell Biol.* 138:1-14.
36. Diaz-Gonzalez, F., J. Forsyth, B. Steiner, and M. H. Ginsberg. 1996. Trans-dominant inhibition of integrin function. *Mol Biol Cell* 7:1939-51.
37. Dietzen, D. J., W. R. Hastings, and D. M. Lublin. 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270:6838-42.
38. Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller, and T. V. Kurzchalia. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293:2449-52.
39. Dupree, P., R. G. Parton, G. Raposo, T. V. Kurzchalia, and K. Simons. 1993. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J* 12:1597-605.
40. Echarrri, A., O. Muriel, and M. A. Del Pozo. 2007. Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. *Semin Cell Dev Biol* 18:627-37.
41. Etienne-Manneville, S. 2004. Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* 117:1291-300.
42. Ezratty, E. J., M. A. Partridge, and G. G. Gundersen. 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* 7:581-90.
43. Feigelson, S. W., V. Grabovsky, E. Winter, L. L. Chen, R. B. Pepinsky, T. Yednock, D. Yablonski, R. Lobb, and R. Alon. 2001. The Src kinase p56(lck) up-regulates VLA-4 integrin affinity. Implications for rapid spontaneous and chemokine-triggered T cell adhesion to VCAM-1 and fibronectin. *J Biol Chem* 276:13891-901.
44. Feron, O., L. Belhassen, L. Kobzik, T. W. Smith, R. A. Kelly, and T. Michel. 1996. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271:22810-4.
45. Fu, Y., A. Hoang, G. Escher, R. G. Parton, Z. Krozowski, and D. Sviridov. 2004. Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J Biol Chem* 279:14140-6.
46. Fukuyama, T., H. Ogita, T. Kawakatsu, T. Fukuhara, T. Yamada, T. Sato, K. Shimizu, T. Nakamura, M. Matsuda, and Y. Takai. 2005. Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions. *J Biol Chem* 280:815-25.

47. Gaggioli, C., and E. Sahai. 2007. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res* 20:161-72.
48. Galbiati, F., J. A. Engelman, D. Volonte, X. L. Zhang, C. Minetti, M. Li, H. Hou, Jr., B. Kneitz, W. Edelmann, and M. P. Lisanti. 2001. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 276:21425-33.
49. Galvez, B. G., S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, M. Vicente-Manzanares, F. Sanchez-Madrid, and A. G. Arroyo. 2004. Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 15:678-87.
50. Garcia-Cardena, G., P. Oh, J. Liu, J. E. Schnitzer, and W. C. Sessa. 1996. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6448-53.
51. Ge, S., and J. S. Pachter. 2004. Caveolin-1 knockdown by small interfering RNA suppresses responses to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 by human astrocytes. *J Biol Chem* 279:6688-95.
52. Geiger, B., and A. Bershadsky. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 13:584-92.
53. Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:793-805.
54. Glenney, J. R., Jr. 1989. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 264:20163-6.
55. Glenney, J. R., and L. Zokas. 1989. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 108:2401-2408.
56. Gonzalez, E., A. Nagiel, A. J. Lin, D. E. Golan, and T. Michel. 2004. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J Biol Chem* 279:40659-69.
57. Gotoh, A., H. Takahira, R. L. Geahlen, and H. E. Broxmeyer. 1997. Cross-linking of integrins induces tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product Vav and the protein tyrosine kinase Syk in human factor-dependent myeloid cells. *Cell Growth Differ* 8:721-9.
58. Grande-Garcia, A., and M. A. Del Pozo. 2008. Caveolin-1 in cell polarization and directional migration. *Eur J Cell Biol.*
59. Hakak, Y., and G. S. Martin. 1999. Ubiquitin-dependent degradation of active Src. *Curr Biol* 9:1039-42.
60. Han, J., C. J. Lim, N. Watanabe, A. Soriani, B. Ratnikov, D. A. Calderwood, W. Puzon-McLaughlin, E. M. Lafuente, V. A. Boussiotis, S. J. Shattil, and M. H. Ginsberg. 2006. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Curr Biol* 16:1796-806.
61. Hancock, J. F. 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:456-62.
62. Hassan, G. S., T. M. Williams, P. G. Frank, and M. P. Lisanti. 2006. Caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells show cell autonomous abnormalities in

- proliferation, migration, and endothelin-based signal transduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H2393-401.
63. Hernandez, S. E., J. Settleman, and A. J. Koleske. 2004. Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr Biol* 14:691-6.
  64. Hotchin, N. A., and A. Hall. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J. Cell Biol.* 131:1857-1865.
  65. Hughes, P. E., and M. Pfaff. 1998. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* 8:359-64.
  66. Humphries, M. J. 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28:311-39.
  67. Huttenlocher, A. 2005. Cell polarization mechanisms during directed cell migration. *Nat Cell Biol* 7:336-7.
  68. Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-87.
  69. Isshiki, M., and R. G. Anderson. 2003. Function of caveolae in Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup>-dependent signal transduction. *Traffic* 4:717-23.
  70. Jaffe, A. B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-69.
  71. Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J. V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* 146:1033-44.
  72. Kawakatsu, T., H. Ogita, T. Fukuhara, T. Fukuyama, Y. Minami, K. Shimizu, and Y. Takai. 2005. Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J Biol Chem* 280:4940-7.
  73. Kiosses, W. B., S. J. Shattil, N. Pampori, and M. A. Schwartz. 2001. Rac recruits high-affinity integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat. Cell Biol.* 3:316-320.
  74. Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda. 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev* 12:3331-6.
  75. Klemke, R. L., J. Leng, R. Molander, P. C. Brooks, K. Vuori, and D. A. Cheresh. 1998. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol* 140:961-72.
  76. Kurokawa, K., and M. Matsuda. 2005. Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol Biol Cell* 16:4294-303.
  77. Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras, and R. Beliveau. 2004. Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 279:52132-40.
  78. Laukaitis, C. M., D. J. Webb, K. Donais, and A. F. Horwitz. 2001. Differential dynamics of  $\alpha$ 5 integrin, paxillin, and  $\alpha$ -actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol* 153:1427-40.

79. Le Lay, S., and T. V. Kurzchalia. 2005. Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim Biophys Acta* 1746:322-33.
80. Lee, H., D. Volonte, F. Galbati, P. Iyengar, D. M. Lublin, D. B. Bregman, M. T. Wilson, R. Campos-Gonzalez, B. Bouzahzah, R. G. Pestell, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 2000. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav- 1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 14:1750-75.
81. Leeuwen, F. N., H. E. Kain, R. A. Kammen, F. Michiels, O. W. Kranenburg, and J. G. Collard. 1997. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol* 139:797-807.
82. Li, S., J. Couet, and M. P. Lisanti. 1996. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271:29182-90.
83. Li, S., T. Okamoto, M. Chun, M. Sargiacomo, J. E. Casanova, S. H. Hansen, I. Nishimoto, and M. P. Lisanti. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* 270:15693-701.
84. Li, S., R. Seitz, and M. P. Lisanti. 1996. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem* 271:3863-8.
85. Li, Z., M. Hannigan, Z. Mo, B. Liu, W. Lu, Y. Wu, A. V. Smrcka, G. Wu, L. Li, M. Liu, C. K. Huang, and D. Wu. 2003. Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* 114:215-27.
86. Liddington, R. C., and M. H. Ginsberg. 2002. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* 158:833-9.
87. Ling, K., R. L. Doughman, V. V. Iyer, A. J. Firestone, S. F. Bairstow, D. F. Mosher, M. D. Schaller, and R. A. Anderson. 2003. Tyrosine phosphorylation of type Igammaphosphatidylinositol phosphate kinase by Src regulates an integrin-talin switch. *J Cell Biol* 163:1339-49.
88. Lisanti, M. P., P. E. Scherer, J. Vidugiriene, Z. Tang, A. Hermanowski-Vosatka, Y. H. Tu, R. F. Cook, and M. Sargiacomo. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126:111-26.
89. Liu, J., P. Oh, T. Horner, R. A. Rogers, and J. E. Schnitzer. 1997. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J Biol Chem* 272:7211-22.
90. Liu, P., M. Rudick, and R. G. Anderson. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 277:41295-8.
91. Lu, C., J. Takagi, and T. A. Springer. 2001. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem* 276:14642-8.
92. Machesky, L., P. Jurdic, and B. Hinz. 2008. Grab, stick, pull and digest: the functional diversity of actin-associated matrix-adhesion structures. Workshop on Invadopodia, Podosomes and Focal Adhesions in Tissue Invasion. *EMBO Rep* 9:139-43.

93. Machesky, L. M., and A. Hall. 1997. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* 138:913-26.
94. Mammoto, A., S. Huang, and D. E. Ingber. 2007. Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts. *J Cell Sci* 120:456-67.
95. Meili, R., and R. A. Firtel. 2003. Two poles and a compass. *Cell* 114:153-6.
96. Meller, N., M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, M. A. Del Pozo, and M. A. Schwartz. 2002. Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat Cell Biol* 4:639-47.
97. Meng, W., M. Numazaki, K. Takeuchi, Y. Uchibori, Y. Ando-Akatsuka, M. Tominaga, and T. Tominaga. 2004. DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src-dependent manner. *Embo J* 23:760-71.
98. Meyer, S. C., S. Zuerbig, C. C. Cunningham, J. H. Hartwig, T. Bissell, K. Gardner, and J. E. Fox. 1997. Identification of the region in actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein IB $\alpha$ . *J Biol Chem* 272:2914-9.
99. Miao, H., S. Li, Y. L. Hu, S. Yuan, Y. Zhao, B. P. Chen, W. Puzon-McLaughlin, T. Tarui, J. Y. Shyy, Y. Takada, S. Usami, and S. Chien. 2002. Differential regulation of Rho GTPases by  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 integrins: the role of an extracellular domain of integrin in intracellular signaling. *J Cell Sci* 115:2199-206.
100. Millard, T. H., S. J. Sharp, and L. M. Machesky. 2004. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* 380:1-17.
101. Miyamoto, Y., J. Yamauchi, and H. Itoh. 2003. Src kinase regulates the activation of a novel FGD-1-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor in the signaling pathway from the endothelin A receptor to JNK. *J Biol Chem* 278:29890-900.
102. Monier, S., D. J. Dietzen, W. R. Hastings, D. M. Lublin, and T. V. Kurzchalia. 1996. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett* 388:143-9.
103. Monier, S., R. G. Parton, F. Vogel, J. Behlke, A. Henske, and T. V. Kurzchalia. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6:911-27.
104. Mora, R., V. L. Bonilha, A. Marmorstein, P. E. Scherer, D. Brown, M. P. Lisanti, and E. Rodriguez-Boulan. 1999. Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J Biol Chem* 274:25708-17.
105. Mould, A. P. 1996. Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *J Cell Sci* 109 ( Pt 11):2613-8.
106. Mould, A. P., J. A. Askari, S. Barton, A. D. Kline, P. A. McEwan, S. E. Craig, and M. J. Humphries. 2002. Integrin activation involves a conformational change in the  $\alpha$ 1 helix of the  $\beta$  subunit A-domain. *J Biol Chem* 277:19800-5.
107. Mould, A. P., M. A. Travis, S. J. Barton, J. A. Hamilton, J. A. Askari, S. E. Craig, P. R. Macdonald, R. A. Kammerer, P. A. Buckley, and M. J. Humphries. 2005. Evidence that monoclonal antibodies directed against the integrin  $\beta$  subunit

- plexin/semaphorin/integrin domain stimulate function by inducing receptor extension. *J Biol Chem* 280:4238-46.
108. Narang, A. 2006. Spontaneous polarization in eukaryotic gradient sensing: a mathematical model based on mutual inhibition of frontness and backness pathways. *J Theor Biol* 240:538-53.
  109. Navarro, A., B. Anand-Apte, and M. O. Parat. 2004. A role for caveolae in cell migration. *Faseb J* 18:1801-11.
  110. Nimnual, A. S., L. J. Taylor, and D. Bar-Sagi. 2003. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol* 5:236-41.
  111. Nobes, C. D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.
  112. Noren, N. K., W. T. Arthur, and K. Burridge. 2003. Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J Biol Chem* 278:13615-8.
  113. O'Connor, K. L., B. K. Nguyen, and A. M. Mercurio. 2000. RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism. *J Cell Biol* 148:253-8.
  114. Ohta, Y., J. H. Hartwig, and T. P. Stossel. 2006. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol* 8:803-14.
  115. Okamoto, T., A. Schlegel, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273:5419-5422.
  116. Olofsson, B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal.* 11:545-554.
  117. O'Toole, T., Y. Katagiri, R. Faull, K. Peter, R. Tamura, V. Quaranta, J. Loftus, S. Shattil, and M. Ginsberg. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 124:1047-1059.
  118. Palazzo, A. F., T. A. Cook, A. S. Alberts, and G. G. Gundersen. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 3:723-9.
  119. Palazzo, A. F., C. H. Eng, D. D. Schlaepfer, E. E. Marcantonio, and G. G. Gundersen. 2004. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* 303:836-9.
  120. Palazzo, A. F., H. L. Joseph, Y. J. Chen, D. L. Dujardin, A. S. Alberts, K. K. Pfister, R. B. Vallee, and G. G. Gundersen. 2001. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol* 11:1536-41.
  121. Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K. M. Yamada. 2005. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol* 170:793-802.
  122. Parat, M. O., B. Anand-Apte, and P. L. Fox. 2003. Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol Biol Cell* 14:3156-68.



123. Parolini, I., M. Sargiacomo, F. Galbiati, G. Rizzo, F. Grignani, J. A. Engelman, T. Okamoto, T. Ikezu, P. E. Scherer, R. Mora, E. Rodriguez-Boulan, C. Peschle, and M. P. Lisanti. 1999. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem* 274:25718-25.
124. Pear, W. S., J. P. Miller, L. Xu, J. C. Pui, B. Soffer, R. C. Quackenbush, A. M. Pendergast, R. Bronson, J. C. Aster, M. L. Scott, and D. Baltimore. 1998. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 92:3780-92.
125. Pelham, R. J., Jr., and Y. Wang. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13661-5.
126. Pertz, O., L. Hodgson, R. L. Klemke, and K. M. Hahn. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440:1069-72.
127. Pfaff, M., S. Liu, D. J. Erle, and M. H. Ginsberg. 1998. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 273:6104-9.
128. Podar, K., R. Shringarpure, Y. T. Tai, M. Simoncini, M. Sattler, K. Ishitsuka, P. G. Richardson, T. Hideshima, D. Chauhan, and K. C. Anderson. 2004. Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Res* 64:7500-6.
129. Price, L. S., J. Leng, M. A. Schwartz, and G. M. Bokoch. 1998. Activation of rac and cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol. Biol. Cell* 9:1863-1871.
130. Puyraimond, A., R. Fridman, M. Lemesle, B. Arbeille, and S. Menashi. 2001. MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells. *Exp Cell Res* 262:28-36.
131. Radel, C., M. Carlile-Klusacek, and V. Rizzo. 2007. Participation of caveolae in beta1 integrin-mediated mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 358:626-31.
132. Radel, C., and V. Rizzo. 2005. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H936-45.
133. Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265:23-32.
134. Ravid, D., S. Maor, H. Werner, and M. Liscovitch. 2006. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv Enzyme Regul* 46:163-75.
135. Razani, B., J. A. Engelman, X. B. Wang, W. Schubert, X. L. Zhang, C. B. Marks, F. Macaluso, R. G. Russell, M. Li, R. G. Pestell, D. Di Vizio, H. Hou, Jr., B. Kneitz, G. Lagaud, G. J. Christ, W. Edelmann, and M. P. Lisanti. 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276:38121-38.
136. Razani, B., X. B. Wang, J. A. Engelman, M. Battista, G. Lagaud, X. L. Zhang, B. Kneitz, H. Hou, Jr., G. J. Christ, W. Edelmann, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 22:2329-44.
137. Razani, B., S. E. Woodman, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54:431-67.

138. Ren, X. D., W. B. Kiosses, and M. A. Schwartz. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *Embo J* 18:578-85.
139. Ren, X. D., W. B. Kiosses, D. J. Sieg, C. A. Otey, D. D. Schlaepfer, and M. A. Schwartz. 2000. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J Cell Sci* 113 ( Pt 20):3673-8.
140. Renshaw, M. W., E. Lea-Chou, and J. Y. J. Wang. 1996. Rac is required for v-Abl tyrosine kinase to activate mitogenesis. *Curr. Biol.* 6:76-83.
141. Ridley, A. J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399.
142. Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704-9.
143. Riveline, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A. D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153:1175-86.
144. Roche, S., S. Fumagalli, and S. A. Courtneidge. 1995. Requirement for src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science* 269:1567-1569.
145. Roof, R. W., M. D. Haskell, B. D. Dukes, N. Sherman, M. Kinter, and S. J. Parsons. 1998. Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol Cell Biol* 18:7052-63.
146. Rottner, K., A. Hall, and J. V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* 9:640-8.
147. Sander, E. E., J. P. ten Klooster, S. van Delft, R. A. van der Kammen, and J. G. Collard. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147:1009-22.
148. Sanders, L. C., F. Matsumura, G. M. Bokoch, and P. de Lanerolle. 1999. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283:2083-5.
149. Santilman, V., J. Baran, B. Anand-Apte, R. M. Evans, and M. O. Parat. 2007. Caveolin-1 polarization in transmigrating endothelial cells requires binding to intermediate filaments. *Angiogenesis* 10:297-305.
150. Saoncella, S., F. Echtermeyer, F. Denhez, J. K. Nowlen, D. F. Mosher, S. D. Robinson, R. O. Hynes, and P. F. Goetinck. 1999. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2805-10.
151. Scherer, P. E., R. Y. Lewis, D. Volonte, J. A. Engelman, F. Galbiati, J. Couet, D. S. Kohtz, E. van Donselaar, P. Peters, and M. P. Lisanti. 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272:29337-46.
152. Scherer, P. E., T. Okamoto, M. Chun, I. Nishimoto, H. F. Lodish, and M. P. Lisanti. 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:131-5.



153. Scherer, P. E., Z. Tang, M. Chun, M. Sargiacomo, H. F. Lodish, and M. P. Lisanti. 1995. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 270:16395-401.
154. Schlegel, A., P. Arvan, and M. P. Lisanti. 2001. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276:4398-408.
155. Schlegel, A., R. B. Schwab, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1999. A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. *J Biol Chem* 274:22660-7.
156. Schmidt, A., and A. Hall. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-609.
157. Schnitzer, J. E. 2001. Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 49:265-80.
158. Schwartz, M. A., and S. J. Shattil. 2000. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends. Biochem. Sci.* 25:388-391.
159. Servitja, J. M., M. J. Marinissen, A. Sodhi, X. R. Bustelo, and J. S. Gutkind. 2003. Rac1 function is required for Src-induced transformation: Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J Biol Chem* 278:16161-16169.
160. Sharma, C. P., R. M. Ezzell, and M. A. Arnaout. 1995. Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J Immunol* 154:3461-70.
161. Shaul, P. W., and R. G. Anderson. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275:L843-51.
162. Sheetz, M. P., D. Felsenfeld, C. G. Galbraith, and D. Choquet. 1999. Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp* 65:233-43.
163. Sigal, Y. J., O. A. Quintero, R. E. Cheney, and A. J. Morris. 2007. Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein. *J Cell Sci* 120:340-52.
164. Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-9.
165. Singer, A. J., and R. A. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341:738-46.
166. Small, J. V., and I. Kaverina. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 15:40-7.
167. Smart, E. J., Y. Ying, W. C. Donzell, and R. G. Anderson. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271:29427-35.
168. Snapper, S. B., F. Takeshima, I. Anton, C. H. Liu, S. M. Thomas, D. Nguyen, D. Dudley, H. Fraser, D. Purich, M. Lopez-Illasaca, C. Klein, L. Davidson, R. Bronson, R. C. Mulligan, F. Southwick, R. Geha, M. B. Goldberg, F. S. Rosen, J. H. Hartwig, and F.

- W. Alt. 2001. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol* 3:897-904.
169. Song, K. S., M. Sargiacomo, F. Galbiati, M. Parenti, and M. P. Lisanti. 1997. Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 43:293-303.
170. Song, K. S., P. E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D. S. Kohtz, and M. P. Lisanti. 1996. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 271:15160-5.
171. Sonveaux, P., P. Martinive, J. DeWever, Z. Batova, G. Daneau, M. Pelat, P. Ghisdal, V. Gregoire, C. Dessy, J. L. Balligand, and O. Feron. 2004. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res* 95:154-61.
172. Spisni, E., V. Tomasi, A. Cestaro, and S. C. Tosatto. 2005. Structural insights into the function of human caveolin 1. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1383-90.
173. Springer, T. A. 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:65-72.
174. Stahlhut, M., and B. van Deurs. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* 11:325-337.
175. Stewart, M., and N. Hogg. 1996. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* 61:554-61.
176. Sun, X. H., D. C. Flynn, V. Castranova, L. L. Millecchia, A. R. Beardsley, and J. Liu. 2007. Identification of a novel domain at the N terminus of caveolin-1 that controls rear polarization of the protein and caveolae formation. *J Biol Chem* 282:7232-41.
177. Sunaga, N., K. Miyajima, M. Suzuki, M. Sato, M. A. White, R. D. Ramirez, J. W. Shay, A. F. Gazdar, and J. D. Minna. 2004. Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Res* 64:4277-85.
178. Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg, and D. A. Calderwood. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302:103-6.
179. Takagi, J., H. P. Erickson, and T. A. Springer. 2001. C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1. *Nat Struct Biol* 8:412-6.
180. Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz, and T. A. Springer. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110:599-11.
181. Tang, Z., P. E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D. S. Kohtz, I. Nishimoto, H. F. Lodish, and M. P. Lisanti. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271:2255-61.
182. Tschardtke, M., R. Pofahl, A. Chrostek-Grashoff, N. Smyth, C. Niessen, C. Niemann, B. Hartwig, V. Herzog, H. W. Klein, T. Krieg, C. Brakebusch, and I. Haase. 2007. Impaired epidermal wound healing in vivo upon inhibition or deletion of Rac1. *J Cell Sci* 120:1480-90.

183. Tsubouchi, A., J. Sakakura, R. Yagi, Y. Mazaki, E. Schaefer, H. Yano, and H. Sabe. 2002. Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol* 159:673-83.
184. Tu, S., W. J. Wu, J. Wang, and R. A. Cerione. 2003. Epidermal growth factor-dependent regulation of Cdc42 is mediated by the Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278:49293-300.
185. Uittenbogaard, A., and E. J. Smart. 2000. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem* 275:25595-9.
186. Valasek, M. A., J. Weng, P. W. Shaul, R. G. Anderson, and J. J. Repa. 2005. Caveolin-1 is not required for murine intestinal cholesterol transport. *J Biol Chem* 280:28103-9.
187. Vicente-Manzanares, M., D. J. Webb, and A. R. Horwitz. 2005. Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 118:4917-9.
188. Volberg, T., L. Romer, E. Zamir, and B. Geiger. 2001. pp60(c-src) and related tyrosine kinases: a role in the assembly and reorganization of matrix adhesions. *J Cell Sci* 114:2279-89.
189. Vuori, K., H. Hirai, S. Aizawa, and E. Ruoslahti. 1996. Induction of p130<sup>cas</sup> signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for src family kinases. *Mol. Cell Biol.* 16:2606-2613.
190. Wary, K. K., A. Mariotti, C. Zurzolo, and F. G. Giancotti. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell.* 94:625-634.
191. Webb, D. J., J. T. Parsons, and A. F. Horwitz. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells - over and over and over again. *Nat Cell Biol* 4:E97-E100.
192. Wei, Y., X. Yang, Q. Liu, J. A. Wilkins, and H. A. Chapman. 1999. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J. Cell Biol.* 144:1285-1294.
193. Williams, T. M., M. W. Cheung, D. S. Park, B. Razani, A. W. Cohen, W. J. Muller, D. Di Vizio, N. G. Chopra, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2003. Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell* 14:1027-42.
194. Williams, T. M., and M. P. Lisanti. 2005. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C494-506.
195. Williams, T. M., and M. P. Lisanti. 2004. The caveolin proteins. *Genome Biol* 5:214.
196. Woodman, S. E., A. W. Ashton, W. Schubert, H. Lee, T. M. Williams, F. A. Medina, J. B. Wyckoff, T. P. Combs, and M. P. Lisanti. 2003. Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *Am J Pathol* 162:2059-68.
197. Xu, J., F. Wang, A. Van Keymeulen, P. Herzmark, A. Straight, K. Kelly, Y. Takuwa, N. Sugimoto, T. Mitchison, and H. R. Bourne. 2003. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* 114:201-14.
198. Yron, I., M. Deckert, M. E. Reff, A. Munshi, M. A. Schwartz, and A. Altman. 1999. Integrin-dependent tyrosine phosphorylation and growth regulation by Vav. *Cell Adhes Commun* 7:1-11.

199. Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* 116:4605-13.
200. Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* 32:416-20.
201. Zamir, E., B. Z. Katz, S. Aota, K. M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 112 ( Pt 11):1655-69.
202. Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K. M. Yamada, B. Z. Katz, S. Lin, D. C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, and B. Geiger. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2:191-6.
203. Zhang, W., B. Razani, Y. Altschuler, B. Bouzahzah, K. E. Mostov, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2000. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *J Biol Chem* 275:20717-25.

## **8 ANEXO I: VIDEOMICROSCOPÍA (CD)**



**VIDEOS INCLUIDOS EN EL ANEXO I:**

**Videos 1 y 2:** Reciclaje de las estructuras de adhesión (paxilina-GFP) en MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup>, respectivamente.

**Videos 3 y 4:** Actividad de protrusión (blanco) y de retracción (negro) de membrana de los MEFs WT y Cav1<sup>-/-</sup>, respectivamente.

**Videos 5, 6 y 7:** Migración en ausencia de gradientes quimiotácticos de MEFs WT (5), MEFs Cav1<sup>-/-</sup> (6) y MEFs Cav1<sup>-/-</sup> transfectados de forma estable con Cav1 (7).

**Videos 8, 9 y 10:** Ensayos de cierre de herida en monocapas de MEFs WT (8), MEFs Cav1<sup>-/-</sup> (9) y MEFs Cav1<sup>-/-</sup> transfectados de forma estable con Cav1 (10).

(Para detalles técnicos de los videos, véase la sección de “Materiales y Métodos”)





## **9 ANEXO II: PUBLICACIONES**



**Publicaciones del autor relacionadas con el trabajo de la tesis:**

**Grande-García A**, Echarri A, de Rooij J, Alderson NB, Waterman-Storer CM, Valdivielso JM, del Pozo MA. *Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases*. J Cell Biol. 2007 May 21;177(4):683-94.

del Pozo MA, Balasubramanian N, Alderson NB, Kiosses WB, **Grande-García A**, Anderson RG, Schwartz MA. *Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization*. Nat Cell Biol. 2005 Sep;7(9):901-8.

**Grande-García A** and del Pozo MA. *Caveolin-1 in polarization and directional cell migration*. European Journal of Cell Biology 2008 Mar 27. [Epub ahead of print]

**Grande-García A**, Echarri A, Del Pozo MA. *Integrin regulation of membrane domain trafficking and Rac targeting*. Biochem Soc Trans. 2005 Aug;33(Pt 4):609-13.



# Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases

Araceli Grande-García,<sup>1</sup> Asier Echarri,<sup>1</sup> Johan de Rooij,<sup>2</sup> Nazilla B. Alderson,<sup>1</sup> Clare M. Waterman-Storer,<sup>2</sup> José M. Valdivielso,<sup>1</sup> and Miguel A. del Pozo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Integrin Signaling Laboratory, Department of Vascular Biology and Inflammation, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, 28029 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037

**D**evelopment, angiogenesis, wound healing, and metastasis all involve the movement of cells in response to changes in the extracellular environment. To determine whether caveolin-1 plays a role in cell migration, we have used fibroblasts from knockout mice. Caveolin-1-deficient cells lose normal cell polarity, exhibit impaired wound healing, and have decreased Rho and increased Rac and Cdc42 GTPase activities. Directional persistence of migration is lost, and the cells show an impaired

response to external directional stimuli. Both Src inactivation and p190RhoGAP knockdown restore the wild-type phenotype to caveolin-1-deficient cells, suggesting that caveolin-1 stimulates normal Rho GTP loading through inactivation of the Src-p190RhoGAP pathway. These findings highlight the importance of caveolin-1 in the establishment of cell polarity during directional migration through coordination of the signaling of Src kinase and Rho GTPases.

## Introduction

Cell migration is a key step in many physiological and pathological processes, such as wound repair, embryonic development, tissue regeneration, angiogenesis, and metastasis (Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2005). In an attempt to understand this complex process, migration has been viewed as a multiple-step cycle, where migrating cells become highly polarized and display sequential morphological changes (Sheetz et al., 1999; Ridley et al., 2003). These include extension of protrusions at the cell front, formation of stable adhesions at the leading edge, reorientation of the Golgi and the microtubule organizing center (MTOC) toward the leading edge, translocation of the cell body in the direction of the movement, and focal adhesion (FA) release and retraction at the cell rear (Vicente-Manzanares et al., 2005). These steps are easily observed in slow-moving cells, such as fibroblasts and endothelial cells (Ridley et al., 2003). The acquisition of a highly polarized

phenotype is not generally regarded as a step in the migration process but, rather, as a concomitant and essential event to cell migration (Sánchez-Madrid and del Pozo, 1999; Vicente-Manzanares et al., 2005).

Migration is a very complex process that requires the spatial and temporal integration of different signaling components (for reviews see Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2005), many of which are not yet understood. Among them, the Rho family of small GTPases is one of the master regulators of cell motility, as they control both actin cytoskeleton remodeling as well as FA formation and turnover. FAs are one of the key elements in migration (Geiger and Bershadsky, 2001; DeMali et al., 2003; Ridley et al., 2003; Carragher and Frame, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005). They are formed by the recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to the sites where integrins attach to the ECM. FAs serve as anchorage points for stress fibers (Wehrle-Haller and Imhof, 2002; Carragher and Frame, 2004). Highly regulated, polarized actin polymerization is involved in the protrusion formation at the leading edge of the cell, whereas detachment and retraction of the cell rear involves myosin-dependent contraction of stress fibers in the tail (Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2005). Both FAs and stress fibers are regulated by Rho GTPases. By coordinating the activation of several effectors and, ultimately, actin polymerization, Cdc42 triggers filopodia and Rac regulates lamellipodia

Correspondence to Miguel A. del Pozo: [madelpozo@cnic.es](mailto:madelpozo@cnic.es)

J. de Rooij's present address is Netherlands Cancer Institute, 1066 CX Amsterdam, Netherlands.

J.M. Valdivielso's present address is Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Universidad de Lleida, 25198 Lleida, Spain.

Abbreviations used in this paper: Csk, C-terminal Src kinase; EF, elliptical factor; FA, focal adhesion; Fn, fibronectin; ID, index of directionality; MEF, mouse embryonic fibroblast; MTOC, microtubule organizing center; shRNA, short hairpin RNA; WT, wild-type.

The online version of this article contains supplemental material.

protrusion and membrane ruffles, whereas Rho regulates formation of stress fibers and cell contractility in the cell body, and hence Rho activity is high at the cell contractile tail (Raftopoulos and Hall, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005). Importantly, it has recently been reported that Rho activity is also high at a sharp band immediately adjacent to the leading edge of cells migrating out of a wounded monolayer (Kurokawa and Matsuda, 2005; Pertz et al., 2006). On the other hand, Rac and Cdc42 regulate the initial recruitment of cytoskeletal and signaling proteins into small focal complexes, whereas Rho controls the maturation of these complexes into bigger FAs, as well as FA lifetime (Rottner et al., 1999; Burridge and Wennerberg, 2004; Raftopoulos and Hall, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005).

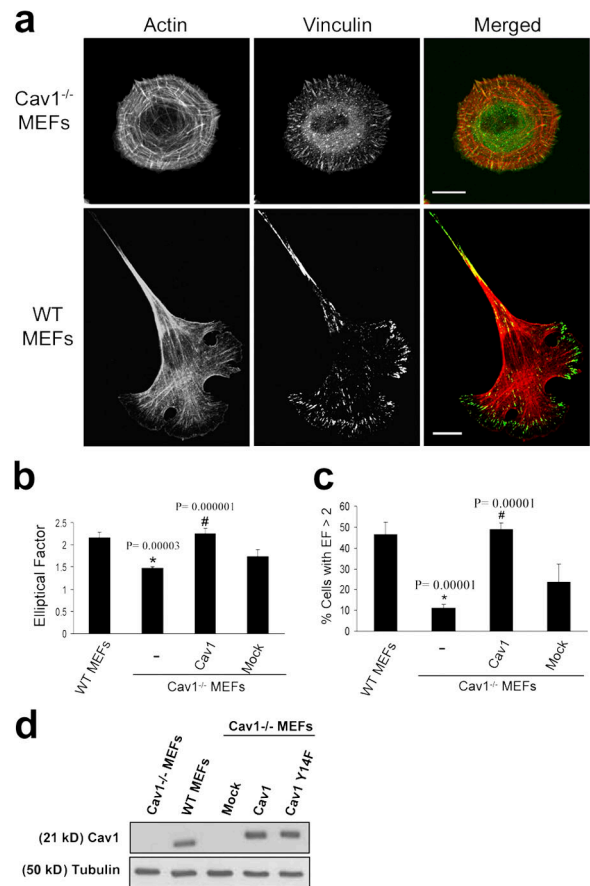
Many other players are involved in the complex regulation of cell migration (Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2005), among them, caveolae and caveolin (Navarro et al., 2004), although in a controversial manner. Caveolae are specialized plasma membrane microdomains with a flask-shaped, invaginated morphology, highly enriched in cholesterol and sphingolipids (Parton et al., 2006). Caveolin is their principal structural component. There are three proteins encoded by the caveolin gene family (caveolin-1, -2, and -3). Caveolin-1 and -2 are coexpressed in numerous cell types, whereas caveolin-3 is muscle specific. It has been proposed that caveolin-1 could play an important role in cell motility by controlling polarization of signaling molecules (Shaul and Anderson, 1998; Isshiki et al., 2002). Supporting this notion, caveolin-1 is linked to the actin cytoskeleton through filamin (Stahlhut and van Deurs, 2000) and has been proposed to associate with a certain subset of integrins (Wary et al., 1998; Wei et al., 1999). On the other hand, caveolin-1 and caveolae present a polarized distribution in migrating endothelial cells (Parat et al., 2003; Beardsley et al., 2005). Moreover, several reports have shown that migration is affected by changes in caveolin-1 expression levels, although in a controversial manner. Some data suggest that caveolin-1 promotes cell migration. Thus, knock down of caveolin-1 expression correlated with a decrease in the chemotaxis of endothelial cells, astrocytes, and multiple myeloma cells (Galvez et al., 2004; Ge and Pachter, 2004; Podar et al., 2004). However, other studies indicate that caveolin-1 could be a negative regulator. For instance, restoration of caveolin-1 expression in MTLn3 cells reduces lamellipodia formation and chemotactic migration (Zhang et al., 2000). Likewise, caveolin-1 knockdown increased directed migration toward sphingosine-1 phosphate in bovine aortic endothelial cells (Gonzalez et al., 2004). Although some of these discrepancies could be ascribed to technical or cell type specificity issues, it seems important to ascertain what kind of role, if any, caveolin-1 plays in the coordinated processes of polarization and migration. We decided to explore this issue by using fibroblasts from caveolin-1-deficient mice. These cells do not express any caveolins, as caveolin-2 is degraded in the absence of caveolin-1 through the proteasomal pathway (Razani et al., 2001), and caveolin-3 is muscle specific. Our results demonstrate that caveolin-1 plays an essential role in the acquisition of a polarized phenotype and, accordingly, in directional cell migration, including both intrinsic persistence of migration and chemotaxis.

It does so by regulating the activation of Src, which in turn regulates signaling by Rho GTPases.

## Results

### Caveolin-1 is required for the acquisition of a normal polarized phenotype in fibroblasts

We compared the morphological phenotype of wild-type (WT) and caveolin-1-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs; Razani et al., 2001) spread on fibronectin (Fn) by immunofluorescence confocal analysis. As shown in Fig. 1 a, Cav1<sup>-/-</sup> MEFs displayed a remarkable morphological change. Most of the WT MEFs exhibited a polarized morphology, with an elongated, polygonal shape (see Fig. 7 g, left). However, Cav1<sup>-/-</sup> MEFs adopted a nonpolarized, rounded shape and displayed an aberrant architecture of the actin cytoskeleton. Stress fibers presented a peripheral, concentric localization, creating cortical

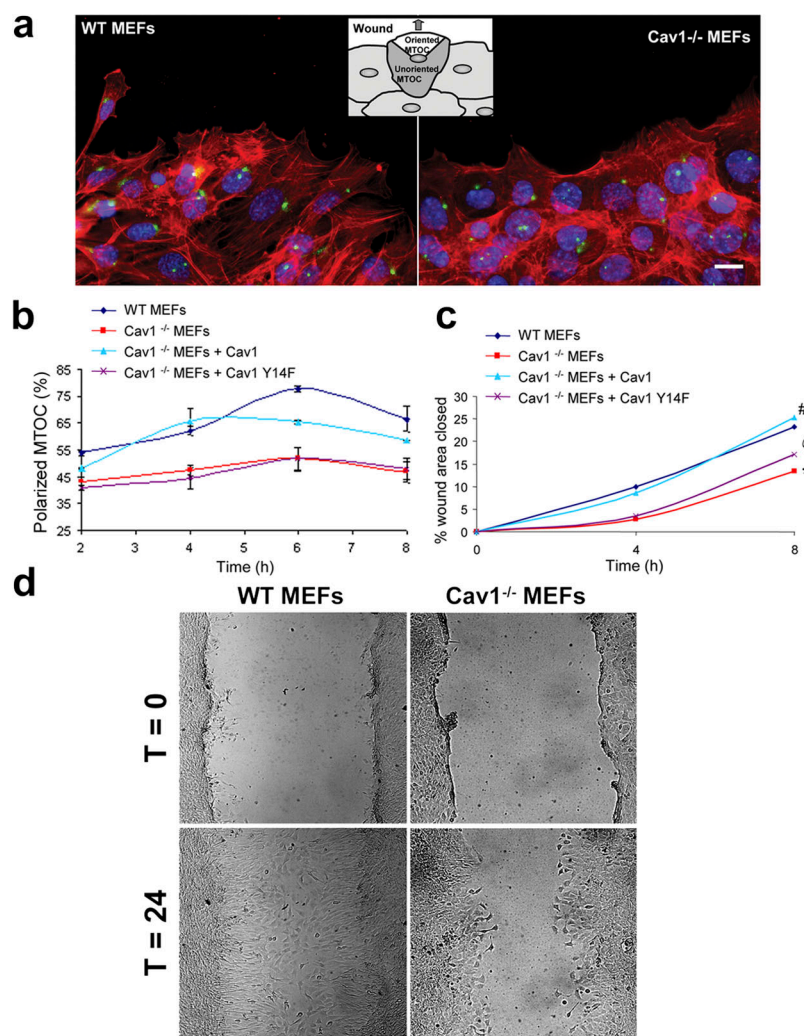


**Figure 1. Cav1<sup>-/-</sup> MEFs show a defect in stress fiber architecture and FAs.** (a) WT and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs were plated on Fn, fixed, and stained with rhodamine phalloidin to reveal the morphology of the actin cytoskeleton. FAs were stained with a mAb to vinculin followed by FITC-conjugated anti-rabbit IgG. Bars, 20  $\mu$ m. (b) The EF (length/breadth), used as a measure of cell polarization, was calculated for WT MEFs ( $n = 797$ ), Cav1<sup>-/-</sup> MEFs ( $n = 663$ ), Cav1-reconstituted knockout MEFs ( $n = 481$ ), and knockout MEFs stably transfected with the empty vector (mock;  $n = 450$ ) plated on Fn. Error bars indicate SEM from five separate experiments. (c) The percentage of cells with EF > 2 was calculated for each cell line. Error bars indicate SEM. (d) WT MEFs, Cav1<sup>-/-</sup> MEFs, and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs reconstituted with empty vector (mock), caveolin-1, or caveolin-1 Y14F were lysed and immunoblotted against caveolin-1 and tubulin. Exogenous caveolin-1 is flag tagged.

actin ring structures, whereas in WT MEFs, stress fibers were organized in bundles aligned along the long axis of the cell. We also detected an alteration in the formation of vinculin-stained FAs. These structures were smaller, much like focal complexes (Geiger and Bershadsky, 2001), and more abundant compared with normal fibroblasts. In addition, adhesions were distributed over the entire ventral surface, whereas in WT MEFs, FAs were mostly located at cell edges. Interestingly, Cav1<sup>-/-</sup> MEFs presented abundant homogeneously distributed vinculin, i.e., not associated with adhesive complexes (Fig. 1 a, top middle), consistent with the altered, immature focal complexes phenotype observed in these cells. Paxillin staining was very similar to that of vinculin (see Fig. 7 g and Fig. S4, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200701006/DC1>). To quantify morphological changes detected in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs, we calculated the elliptical factor (EF), which is defined as the ratio between the longest and the shortest axis in the cell. In WT MEFs, EF was significantly higher than that of Cav1<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 1 b). Importantly, a much higher WT population displayed an EF >2 (indicative of a polarized morphology) compared with the Cav1<sup>-/-</sup> population (Fig. 1 c). Similar results were obtained with fibroblasts prepared from a Cav1 conditional knockout mouse (Valasek et al., 2005) versus their WT littermates

(see Fig. 7 g, bottom; quantified in Fig. S3, b and c). Fibroblasts prepared from these two strains of Cav1<sup>-/-</sup> mice (Razani et al., 2001; Valasek et al., 2005) have been used throughout this study. Cell area measurements showed that Cav1<sup>-/-</sup> cells do not exhibit a delay in cell spreading, and the morphological changes described were still present at late time points after spreading (Fig. S1). Reexpression of caveolin-1 in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 1 d) restored the normal EF (Fig. 1, b and c; and see Fig. 7 g), thus showing that caveolin-1 is required for elongation. Altogether, these results suggest that caveolin-1 is required for the acquisition of an elongated morphology, stress fiber architecture, and FA formation in fibroblasts.

Polarization usually correlates with, but is not equivalent to, elongation. To directly measure cell polarity stimulated by a directional stimulus, we assayed for MTOC polarization in fibroblasts migrating out of a wounded monolayer. MTOC reorientation toward the leading edge was substantially reduced in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs, and Cav1 reexpression restored polarity to levels achieved in WT cells (Fig. 2 a; quantified in Fig. 2 b). Collectively, these results demonstrate a defect in the establishment of cell polarity in the caveolin-1-deficient fibroblasts and establish a correlation between elongation defects and polarization changes in these cells.

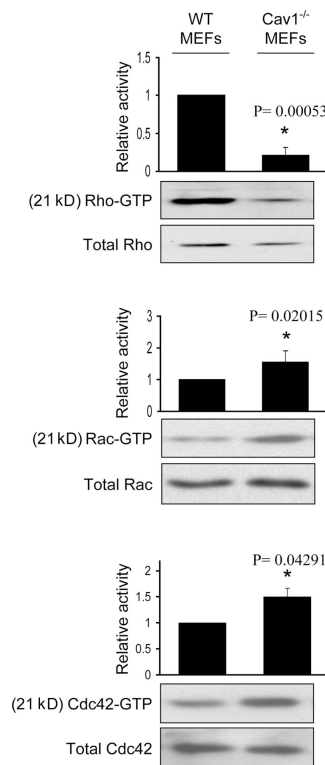


**Figure 2. Polarity is impaired in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs.** (a) MEF monolayers were fixed 2, 4, 6, and 8 h after scratching and immunostained for DNA (blue), actin (red), and pericentrin (green), a marker for the MTOC. Representative wound-edge WT and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs are shown. The criteria for MTOC polarization is explained in the diagram. Bar, 20  $\mu$ m. (b) The percentage of cells in the front row showing reoriented MTOC was measured at the indicated times after wounding. For each time point, 150–300 cells were scored. Values represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments. (c) Graphical representation of wound closure in WT MEFs, Cav1<sup>-/-</sup> MEFs, and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs reconstituted with caveolin-1 or caveolin-1 Y14F are shown. The percentage of closure was measured at 4 and 8 h after wounding. Error bars show SEM from six independent experiments. For 4 h, p values are as follows: \*, P = 0.024 (Cav1<sup>-/-</sup> versus WT MEFs); #, P = 0.033 (Cav1<sup>-/-</sup> + Cav1 versus Cav1<sup>-/-</sup> MEFs);  $\zeta$ , P = 0.039 (Cav1<sup>-/-</sup> + Cav1Y14F versus WT MEFs). For 8 h, p values are as follows: \*, P = 0.020 (Cav1<sup>-/-</sup> versus WT MEFs); #, P = 0.042 (Cav1<sup>-/-</sup> + Cav1 versus Cav1<sup>-/-</sup> MEFs);  $\zeta$ , P = 0.049 (Cav1<sup>-/-</sup> + Cav1Y14F versus WT MEFs). (d) WT and Cav1<sup>-/-</sup> MEF monolayers were scraped with a plastic pipette tip and photographed immediately (t = 0) or after 24 h (t = 24).



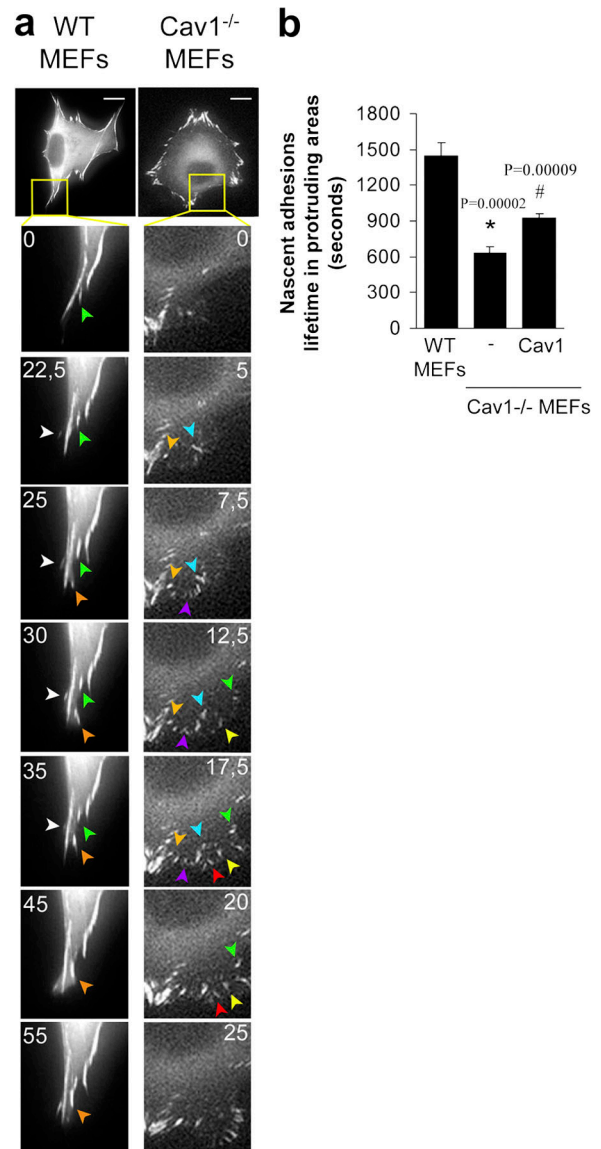
### Caveolin-1 regulates GTP loading of Rho GTPases and their downstream biological consequences

Impaired polarization and defects in the stress fiber and FA pattern in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts suggest alterations in the activity of the GTPases of the Rho family, as they are the principal regulators of these processes (Burridge and Wennerberg, 2004; Raftopoulou and Hall, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005; Pertz et al., 2006). To test this hypothesis, we performed pull-down assays to determine the level of activation of Rho, Rac, and Cdc42 in WT and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs. We found that caveolin-deficient MEFs showed a notable decrease in basal Rho activity and a significant increase in Rac and Cdc42 activity (Fig. 3). To confirm these biochemical observations, we performed several assays designed to test biological consequences downstream of GTPases, namely, protrusion formation and lifetime of nascent adhesions at protruding areas. Time-lapse video recording of paxillin-GFP-expressing MEFs revealed that the lifetime of newly forming adhesions at protruding regions was twofold shorter in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs compared with WT cells (Fig. 4 and Videos 1 and 2, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200701006/DC1>) and was rescued by caveolin-1 expression (Fig. 4). Increased adhesion turnover speed at cell protrusions



**Figure 3. Cav1<sup>-/-</sup> MEFs show alterations in the activity of Rho GTPases.** WT and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs were lysed, and pull-down assays were performed as described in Materials and methods. Proteins bound to GST-PAK binding domain (for Rac and Cdc42) or GST-Rhotekin binding domain (for Rho) were separated by 13% SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and immunoblotted with one of the following antibodies: anti-Rho, anti-Rac1, or anti-Cdc42. Representative Western blots of each GTPase are shown. The diagrams illustrate densitometric analysis of the relative activities of Rho, Rac, and Cdc42, normalized for whole cell lysates and expressed as a ratio to WT MEFs (means  $\pm$  SEM of five to six independent experiments). \*, Statistically significant versus WT MEFs.

in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs is consistent with reduced Rho activity, which could be essential for the maturation of small focal complexes into FAs. In this regard, increased Rac and Cdc42 activity fits with the higher number of immature focal complexes observed in the Cav1<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 4 a, magnified areas). To test whether hyperactivation of Rac and Cdc42 has consequences in membrane protrusion, we performed time-lapse analysis of the protrusive–retractile activity at cell edges. Both protrusive and retractile activities were significantly higher in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 5 and Videos 3 and 4). Careful observation



**Figure 4. Cells lacking caveolin-1 show accelerated turnover of nascent adhesions at protruding areas.** (a) Cells were transiently transfected with pEGFP-paxillin and plated on an Fn matrix, and turnover of newly forming adhesions in protruding areas was monitored by time-lapse video microscopy. Seven frames of two representative cells are shown. The lifetime of several adhesions was followed and pointed with colored arrowheads. Each color indicates a different adhesion. Bars, 20  $\mu$ m. (b) The lifetimes of adhesions were determined in 16 WT cells (274 FAs), 15 Cav1<sup>-/-</sup> MEFs (376 FAs), and 10 Cav1<sup>-/-</sup> MEFs reconstituted with caveolin-1 (354 FAs). Values are means  $\pm$  SEM. \*, Statistically significant versus WT MEFs; #, statistically significant versus Cav1<sup>-/-</sup> MEFs.



of these videos revealed that protrusive activity in WT MEFs is highly directional, i.e., it only occurs in the direction of movement, whereas retraction occurs preferentially at the rear end. However, in *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs, protrusion and retraction is higher and occurs concomitantly throughout the cell perimeter (Fig. 5 and Videos 3 and 4). Quantification of the protrusive and retractive area showed a significant increase in *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs compared with WT MEFs (Fig. 5, b and c).

Altogether, these results indicated that changes in the activity of Rho GTPases could be responsible for the morphological defects observed in *Cav1*<sup>-/-</sup> fibroblasts. To test this hypothesis, we reconstituted the normal GTPase pattern of activity by expressing a constitutively active mutant of Rho (GFP-Rho G14V) or dominant-negative mutants of Rac (GFP-Rac T17N) or Cdc42 (GFP-Cdc42 T17N) in *Cav1*<sup>-/-</sup> fibroblasts. Expression of each individual construct was able to restore the WT elongated phenotype (Fig. S2, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200701006/DC1>). This result most likely reflects the fact that alteration of the proper reciprocal balance between Rho GTPases could account for the polarization defects of *Cav1*<sup>-/-</sup> cells.

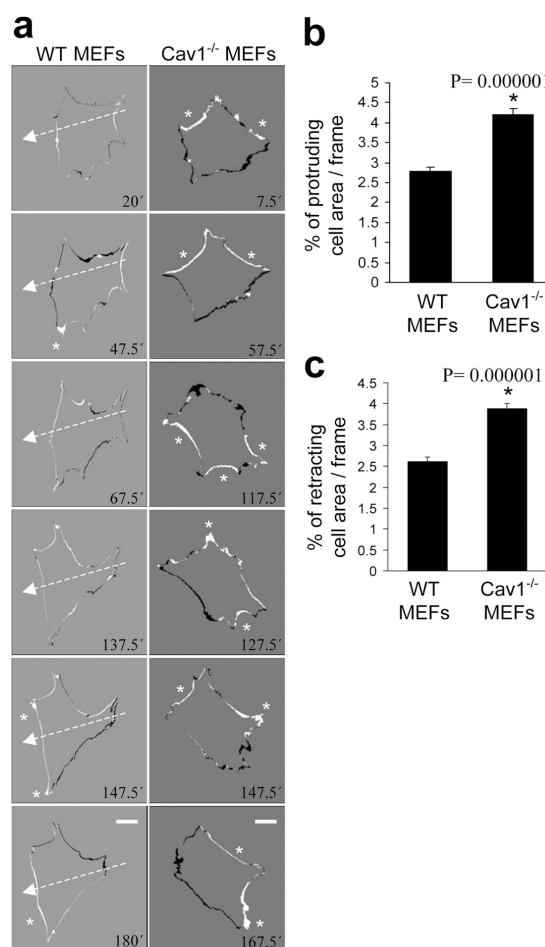
#### Directional migration is impaired in cells lacking caveolin-1

A role for caveolin-1 in cell motility has been previously suggested, although contradictory effects have been reported. In an attempt to elucidate this issue, we performed several migration assays with *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs. As a first approach, we measured the velocity of random migration of these cells on a Fn matrix, using time-lapse microscopy. We found that *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs moved subtly faster compared with WT MEFs (Fig. 6, a and b). However, important differences were observed in the pattern of migration of *Cav1*<sup>-/-</sup> versus WT MEFs (Videos 5 and 6, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200701006/DC1>). WT cells showed an intrinsic directionality or persistency of migration, i.e., they tend to migrate in the same direction for a sustained period of time without turning even in the absence of a chemotactic gradient, whereas *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs completely lost directionality. This observation was confirmed by measuring the trajectory of each individual cell during a 10-h migration period by tracking its centroid from the time-lapse video. To clearly visualize the differences, cell movement paths were reproduced on composite panels (Fig. 6 c). Interestingly, we found that *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs displayed much shorter net translocation (the shortest linear distance from the starting point to the end point of the time-lapse recording) than the WT cells, which showed longer paths and migrated on a straighter way. To quantify these differences, we measured the directional persistence of the cells as estimated by the index of directionality (ID; i.e., the ratio of the net distance divided by the total distance traveled by the cell). The *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs showed a significant reduction in the ID (Fig. 6 d) that was restored by caveolin-1 reexpression (Fig. 6, c and d; and Video 7). These results show that caveolin-1 contributes to persistent migration, i.e., the cell's internal sense of directionality. To explore directional migration stimulated by external stimuli, we performed wound-healing and chemotaxis assays. Both wound closure (Fig. 2, c and d; and Videos 8 and 9)

and the chemotactic response in a transwell assay (Fig. 6 e) were hampered in caveolin-1-deficient MEFs, and reconstituting caveolin-1 expression rescued both responses (Video 10). Collectively, these data demonstrate that caveolin is required in fibroblasts for persistency of migration in the absence of an external chemotactic cue and for directional migration in the presence of an external stimulus, whereas it slightly slows down the velocity of random migration.

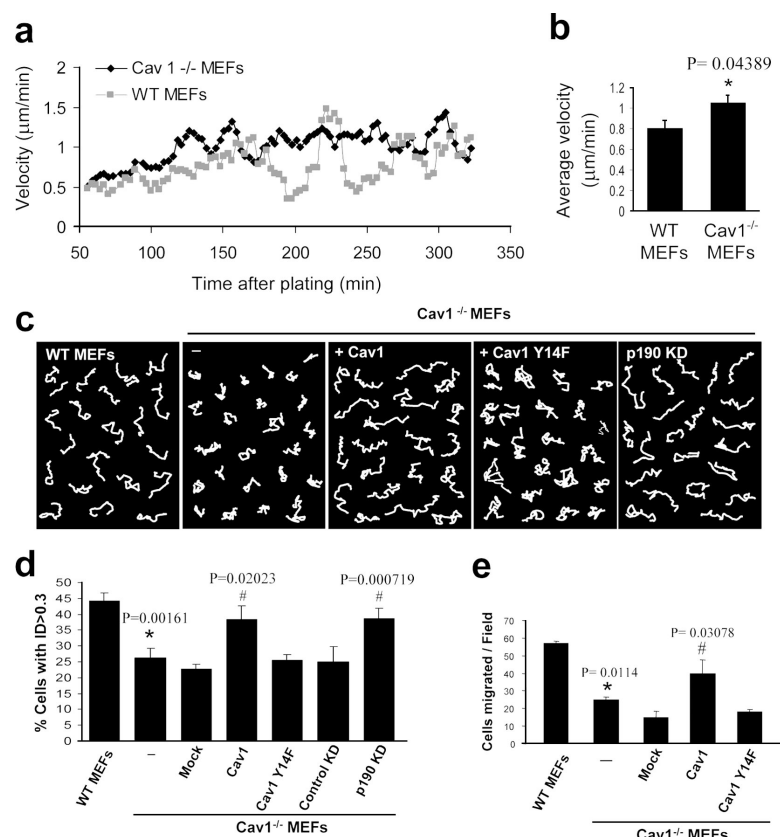
#### Src and p190RhoGAP are involved in the loss of polarity of the *Cav1*<sup>-/-</sup> cells

Caveolin-1 is a substrate for nonreceptor tyrosine kinases, including Src. In fact, caveolin-1 was first described as the major substrate for Src in v-src transformed cell lines (Glenney and Zokas, 1989). Furthermore, it has been described that caveolin phosphorylated on Tyr 14 (pY14-Cav1) can inhibit Src through the recruitment of C-terminal Src kinase (Csk; Cao et al., 2002; Radel and Rizzo, 2005). Thus, we hypothesized that in the



**Figure 5. Cells lacking caveolin-1 show enhanced protrusive activity.** (a) The time-lapse paxillin videos (Fig. 4) were used to calculate cell protrusion as described in Materials and methods. Six subtracted consecutive frames of two representative cells are shown. White areas are the protruded edges, and black areas are retracted edges between two consecutive frames. White arrows indicate the direction of cell movement in the WT cell, and asterisks point to large protrusive areas. Note that *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs did not persistently move in a defined direction. Areas of protrusions (b) and retractions (c) were measured and plotted. Data shown are means  $\pm$  SD. \*, Statistically significant versus WT MEFs. Bars, 20  $\mu$ m.

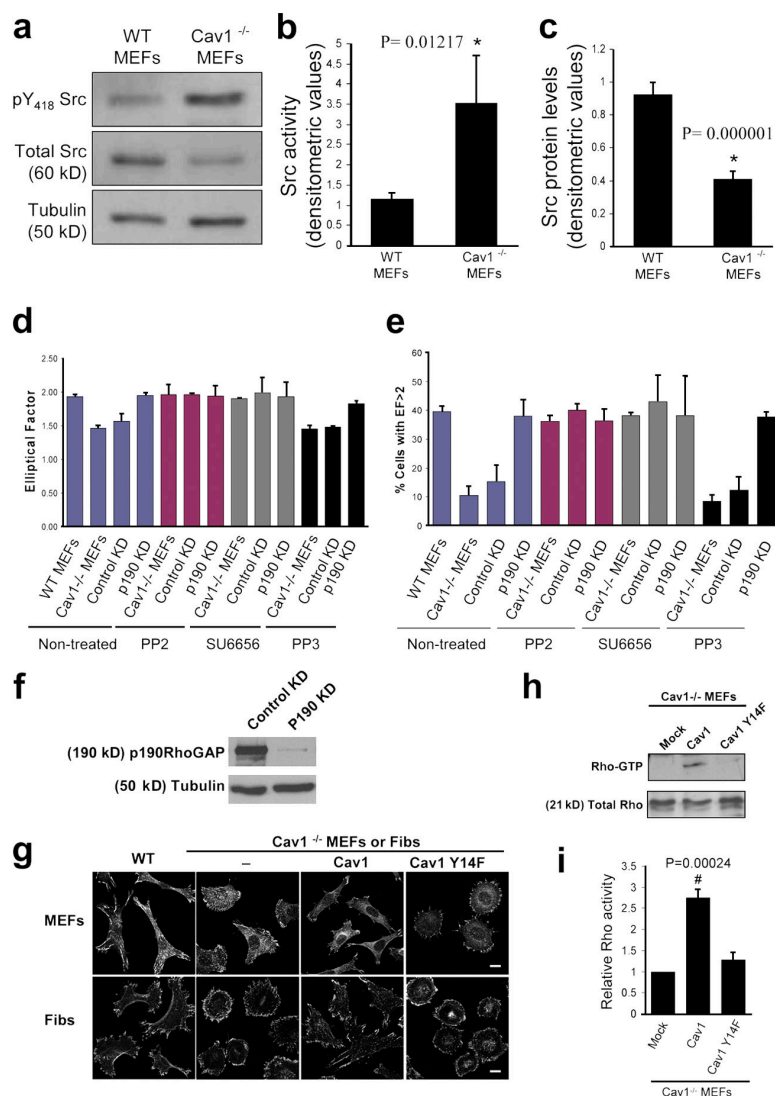
**Figure 6. Directional migration is impaired in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs and can be rescued by WT Cav1 and p190RhoGAP knock-down, but not by Cav1 Y14F.** WT and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs plated on Fn were recorded in random migration by time-lapse video microscopy during a 10-h period (8-min frame interval). (a) Instantaneous velocities of 580–600 cells of each type were quantified and plotted over time on Fn. Cell densities of both populations were equivalent (not depicted). (b) Histograms represent the mean velocities over the 90–330-min period, at which time steady-state velocities were reached. (c) White lines show representative migration tracks of the cell lines indicated at the top of each panel. Composite migration figures were created by coping randomly selected individual migration paths and combining them into a single figure to avoid empty spaces (Pankov et al., 2005). (d) The ID was quantified with Matlab and MetaMorph software. Histograms display the percentage of cells with ID > 0.3 in each cell line. This value (0.3) was the highest mean ID displayed in all experimental conditions tested, and therefore the percentage of cells with ID > 0.3 represents highly directional migratory cells. Data represent means  $\pm$  SEM based on six independent experiments.  $n = 300$ –500 cells of each line. (e) Transwell filters coated with Fn were used to measure the chemotactic response of WT MEFs, Cav1<sup>-/-</sup> MEFs, and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs reconstituted with caveolin-1 or caveolin-1 Y14F using serum as a stimulus. Cells that had migrated during 4 h to the lower surface of the filters were counted in five random fields. Means  $\pm$  SD from four independent experiments are shown. \*, Statistically significant versus WT MEFs; #, statistically significant versus Cav1<sup>-/-</sup> MEFs.



absence of caveolin-1, Src activity could be affected. We evaluated the Tyr 418 phosphorylation state of Src in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs and found an increase in the basal activation of Src (Fig. 7 a; quantified in Fig. 7 b), accompanied by a reduction in the abundance of this protein (Fig. 7, a and c), consistent with the reported increased degradation of active versus inactive Src (Hakak and Martin, 1999). Increased Src activity in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs suggested that Src could be involved in the morphological changes observed in the absence of caveolin-1. To test this hypothesis, we blocked Src activation by treating the Cav1<sup>-/-</sup> MEFs with two inhibitors of Src family kinases, PP2 and SU6656. Interestingly enough, Src inhibition restored the morphological phenotype of the WT MEFs (Fig. 7, d and e; and Fig. S4). Because Src regulates caveolin-1 through phosphorylation of Tyr 14, one requirement of our hypothesis is that expression of a nonphosphorylatable mutant of caveolin-1 in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs should not restore the normal phenotype. Accordingly, cells stably transfected with the Y14F caveolin-1 mutant (Fig. 1 d) did not restore the cell morphological changes (Fig. 7 g), MTOC polarization (Fig. 2 b), wound closure (Fig. 2 c), directionally persistent migration (Fig. 6, c and d), or the chemotactic response (Fig. 6 e), which were restored by WT Cav1 in all cases. These results highlight the importance of caveolin-1 Tyr 14 phosphorylation by Src in the polarization and directed motility of mouse fibroblasts.

Several links have been reported between the activity of Src kinase and Rho GTPases. Thus, Src is involved in activation of Rac (Servitja et al., 2003; Kawakatsu et al., 2005) and Cdc42 (Miyamoto et al., 2003; Tu et al., 2003; Fukuyama et al., 2005) and can inhibit Rho through activation of p190RhoGAP

(Arthur et al., 2000; Brouns et al., 2001; Meng et al., 2004). Therefore, increased Src activity could explain the reduction in Rho GTP levels observed in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts through activation of p190RhoGAP. Both total protein and tyrosine phosphorylated p190RhoGAP levels are mildly elevated in Cav1<sup>-/-</sup> cells (Fig. S5, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200701006/DC1>), supporting this notion. To test this hypothesis, we expressed a dominant-negative mutant of p190RhoGAP in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts and measured the EF. Importantly, GFP-p190 R1283A-expressing Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts showed an elongated shape (Fig. S3). Moreover, knocking down p190RhoGAP expression using RNA interference (Fig. 7 f) led to a recovery of the morphological changes (Fig. 7, d and e; and Fig. S4) and persistent migration defects (Fig. 6 c; quantified in Fig. 6 d). Both Src inhibition and RhoGAP knockdown individually were able to rescue the various phenotypes to the levels achieved in WT cells, and they did not display an additive effect when combining both treatments (Fig. 7, d and e; and Fig. S4). These results suggest that a linear pathway of Src and p190RhoGAP activities drives Rho down-regulation in cells lacking caveolin-1. In this regard, expression of WT caveolin-1, but not the Y14F caveolin-1 mutant, restored Rho GTP loading in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 7, h and i). These findings suggest an important role of caveolin-1 and Src in the establishment of cell polarity by regulating the activity of Rho. Our results support a model in which, in the absence of caveolin-1 expression, Src activity may become insensitive to Csk modulation; increased Src could inactivate Rho in a p190RhoGAP-dependent manner, resulting in profound defects in cell polarization and directed migration.



**Figure 7. Altered phenotype of Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts is dependent on Src and p190RhoGAP.** (a) Activated and total Src were assayed by Western blotting with anti-Src(pY418) phosphospecific antibody and anti-Src pan antibody, respectively. Each of the illustrated blots is representative of five experiments. (b) Src activity was determined densitometrically and expressed as the Src(pY418)/Src ratio. (c) Src protein levels were normalized to tubulin levels in each sample. Values depict means  $\pm$  SEM of five independent experiments. (d) Both Src inhibition and p190RhoGAP knockdown in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs restore the WT morphology pattern. EF was calculated for Cav1<sup>-/-</sup> MEFs treated with two different Src inhibitors, PP2 and SU6656. PP3 was used as a negative control. Data indicate means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). (e) Percentages of cells with EF > 2 are shown for each population ( $n > 100$  cells per condition). Values represent means  $\pm$  SEM from three independent experiments. (f) Cav1<sup>-/-</sup> MEFs were infected with retroviruses encoding for control (control KD) or p190RhoGAP shRNA (p190 KD). Positive cells were sorted, and knockdown was confirmed by a Western blot against p190RhoGAP. As a loading control, anti-tubulin immunoblot is shown. 95% reduction in p190RhoGAP levels was obtained. (g) Cells were plated on Fn-coated plates for 4 h, fixed, and stained with anti-paxillin antibodies. Representative images of each cell line are shown. Fibs, thymus fibroblasts. Bars, 20  $\mu$ m. (h) Cav1<sup>-/-</sup> MEFs reconstituted with empty vector (mock), caveolin-1, or caveolin-1 Y14F were lysed, and pull-down assays were performed as described in Materials and methods. Proteins bound to GST-Rhotekin binding domain (top) and whole cell lysates (bottom) were separated on a 13% SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and immunoblotted with anti-Rho antibodies. (i) The histograms illustrate densitometric analysis of the relative activity of Rho normalized for whole cell lysates and relative to control cells. Means  $\pm$  SEM of six independent experiments are shown. #, Statistically significant versus Cav1<sup>-/-</sup> MEFs transfected with the empty vector.

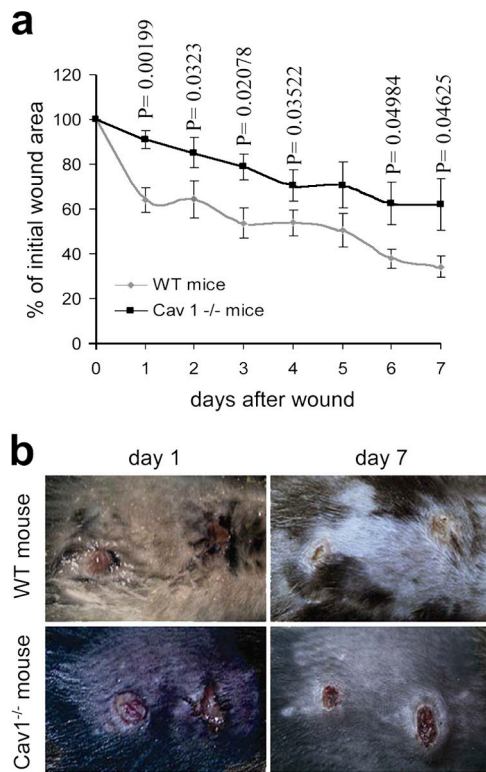
### Impaired skin wound healing in caveolin-1-deficient mice

To explore whether the differences in the migratory behavior observed ex vivo have any correspondence in vivo, we performed wound-healing experiments in the skin of 11-wk-old WT and Cav1<sup>-/-</sup> mice. Wound healing is a complex process involving growth factors, ECM, and epidermal and mesenchymal cells undergoing directional migration, proliferation, and differentiation events (Singer and Clark, 1999). Two 3.5-mm-diameter circular punch biopsies were performed on the back skin of five WT and five Cav1<sup>-/-</sup> mice. The rate of wound healing was monitored as the percentage of the initial wound area left open with time after the punch was made. Cav1<sup>-/-</sup> mice showed a significantly slower wound healing rate compared with WT littermates (Fig. 8 a). As examples, Fig. 8 b shows representative images of WT and Cav1<sup>-/-</sup> wounds 1 and 7 d after the wounds were made. These results indicate that the skin of Cav1<sup>-/-</sup> mice has an impairment in wound healing. Provided the hyperproliferative phenotype of Cav1<sup>-/-</sup> mice (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001), these in vivo findings support our ex vivo observations that caveolin-1 is required for directional migration.

### Discussion

Caveolin-1 is one of the numerous intracellular signaling molecules that have been implicated in cell migration. However, there is no consensus on its role in controlling cell motility, as both positive (Galvez et al., 2004; Ge and Pachter, 2004; Podar et al., 2004) and negative (Zhang et al., 2000; Gonzalez et al., 2004) regulatory effects have been reported. Technical or cell type specificity issues most likely account for this discrepancy. However, provided the relevance of both caveolin-1 and cell migration in both physiology and many pathological conditions, it seems important to further investigate this controversy. In this study, we analyze fibroblasts prepared from two types of Cav1<sup>-/-</sup> mouse (Razani et al., 2001; Valasek et al., 2005) in a variety of polarization and migration assays, including random and directional migration approaches. We have obtained evidence for the requirement of caveolin-1 for the establishment of a polarized and elongated morphology, internal persistency of migration, and externally stimulated directional migration. We show that caveolin-1 regulates polarity and directional migration by affecting the activation patterns of Src and Rho GTPases.





**Figure 8. Wound healing in skin of WT and Cav1<sup>-/-</sup> mice.** Two wounds were created per mouse in five Cav1<sup>-/-</sup> mice and five WT mice ( $n = 10$ ). (a) The graph represents the percentage of initial wound area left at the indicated days after the punch was made (mean  $\pm$  SEM). Statistical analysis shows that the healing rate is significantly different between genotypes 1–4, 6, and 7 d after wound creation (p-values). (b) Representative images of wounds 1 and 7 d after wound creation are shown.

Our results suggest a model in which the modulation of Src activation by the caveolin-1–Csk module (Cao et al., 2002; Radel and Rizzo, 2005) is crucial for the establishment of cell polarity and directional migration. In caveolin-1–deficient cells, Src activity is constitutively high, leading to a p190RhoGAP-dependent decrease in the levels of GTP-loaded Rho and subsequent defects in the arrangement of the actin cytoskeleton.

The first and evident feature we observed in the Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts is a profound change in their morphology and in the actin cytoskeleton architecture. Most of them were rounded and showed stress fibers localized in the cell periphery, creating concentric cortical actin rings. This phenotype suggested alterations in the activity of the GTPases of the Rho family, as they are the principal regulators of polarity and cytoskeletal rearrangements (BurrIDGE and Wennerberg, 2004; Raftopoulos and Hall, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005; Pertz et al., 2006). We found that Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts showed a dramatic decrease in basal Rho activity and a significant increase in Cdc42 and Rac activity, the latter consistent with the reported data for Rac activity upon caveolin-1 silencing (Gonzalez et al., 2004). On the other hand, Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts presented shorter lifetime of nascent adhesions at protrusive areas, compared with the control cells. This is consistent with the low levels of Rho GTP loading, as adhesion turnover inversely correlates with Rho activity (Ren et al., 2000). In addition, these adhesive complexes were smaller and more abundant in Cav1<sup>-/-</sup> than in WT fibroblasts.

This fact indicates a possible blockage in the maturation of these structures, which is also dependent on Rho (Rottner et al., 1999; Geiger and Bershadsky, 2001). The increase in Rac and Cdc42 GTP levels also supports this phenotype, as both GTPases are involved in the creation of new substrate contacts and recruitment of cytoskeletal and signaling proteins into nascent small focal complexes (Rottner et al., 1999; Vicente-Manzanares et al., 2005). Likewise, we found an enhanced, nondirectional protrusive activity in the whole periphery of caveolin-1–deficient cells, in agreement with the altered pattern of activity of Rho GTPases. In fact, both Rho inactivation (Arthur and Burridge, 2001) and Rac activation promote membrane protrusion (Machesky and Hall, 1997; Raftopoulos and Hall, 2004), and there is evidence of a mutual antagonism between both GTPases (Rottner et al., 1999; Sander et al., 1999; Nimmual et al., 2003; Xu et al., 2003; Burridge and Wennerberg, 2004). Interestingly, the use of a fluorescence resonance energy transfer biosensor to measure local activation of Rho has recently established that Rho is active in a sharp band immediately adjacent to the leading edge of migrating cells, both randomly and in a wounded monolayer (Kurokawa and Matsuda, 2005; Pertz et al., 2006). This suggests that Rho is also required for directional migration, and not only for cell contraction, as it was previously established. The dramatic decrease of Rho activity in caveolin-1–deficient cells together with the lack of directionality in these cells is consistent with these reports. The fact that each individual Rho GTPase mutant (active Rho or inactive Rac/Cdc42) restore the normal polarized phenotype is intriguing. The pattern of activity of all three Rho GTPases is altered in caveolin-deficient cells, which complicates the interpretation of this result. It could be explained by the mutual inhibition between the frontness (Rac/Cdc42 dependent) and backness (Rho dependent) pathways (Li et al., 2003; Meili and Firtel, 2003; Xu et al., 2003). Therefore, this result does not necessarily imply that alterations in the GTP loading of each GTPase play a direct role in the phenotype observed in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts, as this could be an indirect effect, through a negative feedback on the opposing pole of the cell. For Rac, apart from increased GTP loading, enhanced plasma membrane targeting in caveolin-1–deficient cells (Del Pozo et al., 2005) could be partially responsible for the phenotype observed. In any case, alteration of the normal reciprocal balance between Rho GTPases most likely contributes to the aberrant cellular morphology and migratory behavior of Cav1<sup>-/-</sup> cells.

Consistent with the morphological phenotype, Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts show a remarkable defect in directional migration, both externally stimulated and internally persistent. Persistence is the intrinsic propensity of the cells to continue migrating in the same direction in the absence of exogenous stimuli (Huttenlocher, 2005). Recently, Pankov et al. (2005) showed that high Rac activity renders a random migration pattern, whereas decreasing Rac activity switches cell migration from random to directionally persistent. Consistently, we found a mild but significant increase in the velocity of random migration and a dramatic switch toward random migration in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts, concomitant with increased Rac GTP levels. Thus, increased Rac activity and/or enhanced Rac membrane targeting

in caveolin-1-deficient cells (Del Pozo et al., 2005) would render nonpolarized increased protrusive activity throughout the whole cell perimeter and, consequently, loss of directionally persistent cell migration. Previous reports where caveolin-1 expression inhibited cell migration (Zhang et al., 2000; Gonzalez et al., 2004; Hassan et al., 2006) fit with our result that Cav1<sup>-/-</sup> cells migrate slightly faster in the absence of an external chemotactic cue. Therefore, previous contradictory results could be reconciled by a detailed analysis of random versus directional migration in caveolin-1-deficient cells. In other cases, divergent results can be ascribed to technical or cell-specific issues. In this regard, a recent report showed that caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells are slightly more migratory than the control cells (Hassan et al., 2006). However, these cells express caveolin-3, which could compensate the absence of caveolin-1. Moreover, these cells were isolated from Ink4a<sup>-/-</sup> mice, which show increased proliferation (Hassan et al., 2006), which could influence the observed results.

The phenotypic deficiencies reported in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts are dependent on caveolin-1, as restoring its expression rescues the WT phenotype. Importantly, this recovery is dependent on caveolin-1 Tyr 14, which is the substrate for Src phosphorylation (Glenney and Zokas, 1989). This phosphorylation is important for fine-tuning of Src activation, as pY14-Cav1 binds to and activates Csk, which phosphorylates inhibitory Tyr 527, resulting in Src inactivation, closing a negative feedback loop (Cao et al., 2002; Radcliff and Rizzo, 2005). These results predict that in the absence of pY14-Cav1, Src should be insensitive to modulation by Csk. Accordingly, we find increased Src activation in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts, and when these cells were reconstituted with a Src-insensitive Y14F caveolin-1 mutant, the normal phenotype was not restored. Increased Src activation was accompanied by a reduction in the protein levels, consistent with previous reports that Src activation leads to increased polyubiquitination and proteasome-dependent degradation (Hakak and Martin, 1999). In spite of protein reduction levels, increased Src activation is functionally relevant because pharmacological inhibition of Src in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts restored the normal phenotype.

Mechanistically, we have found that alterations in the signaling of both Src kinase and Rho GTPases are responsible for the aberrant morphology and migratory pattern of Cav1<sup>-/-</sup> cells. Our results and previous reports allow us to envisage a model in which caveolin-1 influences signaling of Rho GTPases through activated Src. Src regulates the activity of the three major Rho GTPases studied here. It can activate Cdc42 through many pathways, including the exchange factors FRG (Miyamoto et al., 2003), Vav2 (Tu et al., 2003), and C3G (in collaboration with Crk, Rap1, and FRG; Fukuyama et al., 2005). It activates Rac through the exchange factors Dock180 (in collaboration with p130Cas and Crk; DeMali et al., 2003), Tiam1, Vav2 (Servitja et al., 2003), and FRG (through Cdc42 and Vav2; Kawakatsu et al., 2005). However, Src inhibits Rho activity through activation of p190RhoGAP (Arthur et al., 2000; Brouns et al., 2001; Meng et al., 2004). We present evidence that p190RhoGAP is involved in caveolin-mediated alterations of the cell polarity, allowing us to propose this model.

The ex vivo migratory defects reported here are most likely related to the in vivo impaired angiogenic response displayed by Cav1<sup>-/-</sup> mice (Woodman et al., 2003; Sonveaux et al., 2004) and could account for it. Angiogenesis is a complex phenomenon involving both migration and proliferation of endothelial cells (Woodman et al., 2003). In spite of increased cellular proliferation, Matrigel plugs implanted in Cav1<sup>-/-</sup> mice showed reduced blood vessel formation (Woodman et al., 2003), suggesting that decreased migration is most likely responsible for the angiogenic defects. In good agreement, knocking down caveolin-1 expression diminishes the chemotactic response in endothelial cells in vitro (Galvez et al., 2004). We also report here an impaired in vivo wound healing in Cav1<sup>-/-</sup> mice. Wound healing is also a complex process that depends on directional migration, proliferation, and differentiation of epidermal and mesenchymal cells (Singer and Clark, 1999). Because enhanced cell proliferation of Cav1<sup>-/-</sup> mice (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001) would favor the wound-healing process, our results support the notion that decreased directional migration accounts for decreased wound healing observed in vivo. However, caveolin-1 appears to be dispensable for normal embryonic development, as Cav1<sup>-/-</sup> mice are viable (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). Although embryonic development of these animals has not been studied in detail, most likely other signaling pathways involved in the complex migratory process (Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2005) are compensating for caveolin-1 absence. Caveolin-deficient animals display a wide range of phenotypes (Le Lay and Kurzchalia, 2005), and it seems feasible that some of them might be related to the migratory deficiencies reported here. Elucidating such phenotypes is an interesting goal for future work.

## Materials and methods

### Handling of mice

Caveolin-1-deficient mice strain Cav1<sup>tm1Mls</sup>/J and their WT littermates were obtained from The Jackson Laboratory. Mice were housed and maintained in a barrier facility at our institute (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain), which approved the animal protocols. Pathogen-free procedures are used in all mouse rooms. Quarterly health-monitoring reports have been negative for all pathogens in accordance with Federation of European Laboratory Animal Science Associations recommendations. Mice were kept on a 12:12-h light-dark cycle, with ad libitum access to food and water.

### Cell culture

MEFs (Razani et al., 2001) and thymus fibroblasts (Valasek et al., 2005) from Cav1<sup>-/-</sup> and Cav1<sup>+/-</sup> littermate mice have been used throughout this study. M.P. Lisanti (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) and R.G.W. Anderson (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX) provided MEFs and thymus fibroblasts from Cav1<sup>-/-</sup> and Cav1<sup>+/-</sup> littermate mice, respectively. All experiments were performed with both cell types, except from the MTOC polarization assay, Rho GTPase pull downs, and FA lifetime estimations, which were performed only with the MEFs. Cells were maintained in culture in DME supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin.

### DNA plasmids and constructs

Plasmids encoding pEGFP-p190RhoGAP R1283A (Noren et al., 2003); pEGFP-paxillin (Nishiya et al., 2005); and GFP-tagged Rac T17N, Cdc42 T17N, and Rho G14V (del Pozo et al., 1999) were previously described. K. Burridge (University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC) provided GFP-p190 R1283A. C-terminal Flag-tagged mouse caveolin-1 was cut with BamHI-EcoRI, blunt-ended, and ligated to blunt-ended MIGR1

EcoRI, a bicistronic, GFP-expressing retroviral vector (Pear et al., 1998). C-terminal Flag tag caveolin-1 Y14F was cut with BglII-BamHI and ligated to BglII site in MIGR1.

### Generation of stable cell lines by retroviral infection

NIH 3T3 or 293T/17 cells were transfected (using Lipofectamine 2000 or calcium phosphate method) with MIGR1, MIGR1-caveolin-1 or MIGR1-caveolin-1Y14F and packaging plasmid pSV $\psi$ 2. 48 h later, supernatants were filtered and added to Cav1<sup>-/-</sup> MEFs in DME plus 10% FBS containing 4  $\mu$ g/ml polybrene. 48 h later, GFP-positive cells were sorted using a cell sorter (DakoCytomation). Levels of caveolin-1 and caveolin-1 Y14F were similar to endogenous caveolin-1 in MEFs (Fig. 1 d).

### RNA interference-mediated knock down of p190RhoGAP

Mouse p190RhoGAP (available from GenBank/EMBL/DBJ under accession no. NM\_172739) targeting sequence (nucleotides 2935–2953, 5'-gttatggacgcaacattaa-3') and control, nontargeting sequence (5'-gcccgcctttagtgattcg-3') were cloned into short hairpin RNA (shRNA) vector pSuper.Retro.Neo+GFP (Oligoengine) to generate pSuperRetroGFP-p190-2935 and pSuperRetroGFP-Control vectors. Retroviral supernatants were generated by transfecting 293T/17 cells with each shRNA and pSV $\psi$ 2 vector using Eugene 6 (Roche) transfection reagent. Cav1<sup>-/-</sup> MEFs were infected with retroviral supernatants as previously indicated, and high GFP-expressing cells were sorted (~15% of the cell population).

### Antibodies and reagents

mAb against p190RhoGAP was purchased from BD Biosciences. pAb against Cdc42 and mAb against Rho were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Anti-Rac, anti-Src and anti-phosphotyrosine (4G10) mAbs were obtained from Upstate Biotechnology, mAb for vinculin was obtained from Sigma-Aldrich, and anti-Src(pY418) phosphospecific pAb was purchased from Biosource International. Anti-paxillin mAb was purchased from Invitrogen. Rhodamine phalloidin and wheat germ agglutinin labeled with tetramethyl rhodamine were purchased from Invitrogen. Alexa 594 and FITC-conjugated antibody and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse IgG were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories. Src kinase inhibitors SU6656 and PP2, as well as PP3 control, were obtained from Calbiochem. Fn was purified from human plasma as described previously (del Pozo et al., 2000).

### Fluorescence microscopy

Cells were attached to glass coverslips precoated with 5  $\mu$ g/ml Fn for different times. Cells were fixed with 2% formaldehyde-PBS for 20 min, permeabilized in 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 min, and blocked with 10% normal goat serum before staining. Anti-vinculin/paxillin antibodies followed by FITC/Alexa594-conjugated anti-IgG were used to stain FAs. Actin cytoskeleton was stained with rhodamine phalloidin. For polarity determination, membrane of fixed cells was stained with 10  $\mu$ g/ml wheat germ agglutinin for 30 min at RT. Images were acquired using a confocal microscope (Radiance 2100; Bio-Rad Laboratories, Inc.). Then, cells were outlined using the Kirsch edge detection algorithm, which is included in MetaMorph software (Universal Imaging Corp.). Outlines were checked and corrected by hand if necessary. Using MetaMorph's integrated morphometry analysis function, we determined the EF (length/breadth) of cells as a measure of elongation.

### Chemotaxis assays

Transwell cell culture chambers containing polycarbonate membrane with 8- $\mu$ m pore size (Corning Costar Corp.) were coated with 5  $\mu$ g/ml Fn. Cells were starved for 24 h before experiments. After trypsinization and dilution, 15,000 cells in DME plus 0.2% BSA were added to the top Transwell chamber. The bottom compartment was filled with 500  $\mu$ l DME plus 10% FBS, and the assembly was incubated at 37°C for 4 h, to allow cell migration. In the negative controls, bottom chambers were filled with DME plus 0.2% BSA. After incubation, the membranes were washed with PBS, and cells were fixed in 2% formaldehyde and stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocols. Cells that did not migrate were gently removed from the top surface, and cells that had migrated to the bottom of the membrane were counted in five random fields using a fluorescence microscope (Axiovert 200 M SP LSM5; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.).

### Time-lapse video microscopy and FA lifetime analysis

Cells were transiently transfected with pEGFP-paxillin 2 d before the experiment and were plated on a chambered coverglass (eight chambers; Lab-Tek) coated with 5  $\mu$ g/ml Fn. After 45 min, chambers were filled with

Optimem (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, sealed using vacuum grease and a glass plate, and transferred to a microscope heated to 37°C. Image series of FA dynamics were acquired using a 60 $\times$  1.4 NA Plan Apo objective lens on an inverted microscope (Eclipse TE300; Nikon) heated with an airstream incubator (Nevtek) to 37°C. The microscope was equipped with a robotic stage with linear position feedback encoders on the x, y, and z axes (MS-2000; Applied Scientific Instruments) to allow image series to be collected at different stage positions over time. Images were captured using an cooled charge-coupled device camera (Orca II; Hamamatsu). Fluorescent and phase-contrast images were taken in rapid succession at multiple positions, evenly distributed over the chambers to exclude differences due to experimental variation, at 2.5-min intervals for 2.5 h. Phase-contrast image series of cell migratory behavior were collected on a similar microscope system, except using a 20 $\times$  0.5 NA Plan objective lens and a 0.5 NA extra-long working distance condenser, and were captured with a 10-bit chilled charge-coupled device camera (Orca 285; Hamamatsu). For image processing and analyses, we used MetaMorph software. Individual FAs were clearly distinguishable in the GFP-paxillin time-lapse image series. The time of formation and disappearance of the nascent adhesions from protruding areas of different cell types were monitored by eye and double-blind method. From the noted times of appearance and disappearance, the lifetimes of nascent adhesions in WT versus Cav1<sup>-/-</sup> cells were determined, averaged, and plotted, with the error bars indicating the SEM (Videos 1 and 2). To determine cell trajectories in phase-contrast time-lapse image series (cells filmed at 8-min intervals for 10 h), the centroids of the cell nuclei were followed (Videos 5–7). To automate this and allow the unbiased analysis of many cells in multiple time lapses, a program was written in Matlab (Mathworks; de Rooij et al., 2005), which segments images based on pixel intensity and determines the presence of nuclei based on phase density, size, and shape. Nuclei are then linked in consecutive frames using a neural network algorithm, and cells tracked for less than five consecutive frames are automatically discarded. Detection fidelity in our experiments was usually >90%, which was confirmed by eye for each individual time lapse. To prevent erratic conclusions because of false results generated by this automated analysis, a smaller number of random cells from several videos was tracked using the track objects function in MetaMorph, leading to the same results.

### Protrusion-retraction analysis

Fluorescence time-lapse images of GFP-paxillin were used to outline cells by thresholding for pixels with high intensity. Areas covered by cells in consecutive images in the time series were subtracted to determine the percentage change of the total cell area contributing to protrusion or retraction occurring in the 2.5 min elapsed between the two images (Videos 3 and 4). Plotted are means of protrusion over the first 1.5 h of imaging from six different WT and seven different Cav1<sup>-/-</sup> cells.

### In vitro wound-healing assay and determination of MTOC polarization

Cells were grown to confluence on coverglass chambers. Confluent monolayers were scraped with a 0.1–2  $\mu$ l pipette tip. Wound closure was monitored by time-lapse video microscopy. Images were taken at 45-min intervals for 48 h (Videos 8–10). For MTOC polarization assay, cells were seeded on coverslips, and wounded monolayers were fixed 2, 4, 6, and 8 h after scraping. MTOC were localized by immunolabeling using anti-pericentriolar antibodies. Only the first row of the wound edge was measured. Cells in which MTOC was contained by the quadrant facing the wound were scored positive (Fig. 2 a, diagram).

### Wound-healing experiments in vivo

Two full-thickness punch biopsies extending through the epidermis and dermis (punch diameter 3.5 mm) were performed on the back of five WT and five Cav1<sup>-/-</sup> mice (11 wk of age) after depilation. Mice were anesthetized before wound creation. The wound-healing rate was calculated as the percentage of initial wound area with time. After capturing the images with a digital camera (DFC490; Leica), we determined the area of the wound with image analysis software (Leica IM50 Image Manager).

### Pull-down assays and Western blot analysis

Rho, Rac, and Cdc42 activity were determined by pull-down assays as described before (del Pozo et al., 2000; Ren et al., 2000). Src activity was assayed by Western blotting.

### Immunoprecipitation of p190RhoGAP

Low-density WT and Cav1<sup>-/-</sup> MEFs were lysed in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 3 mM EGTA) with phosphatase inhibitors (10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 30 mM NaF, and 3 mM



$\beta$ -glycerophosphate) and protease inhibitors (1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, and 10 mM PMSE). Lysates were spun down at 13,000 g for 10 min, and 500  $\mu$ g of total lysate was used to immunoprecipitate p190RhoGAP with a mAb against it for 2 h. Protein G-Sepharose was added for another 2 h, and immunocomplexes were washed five times and run on an SDS-PAGE. Tubulin, phosphorylated, and total p190RhoGAP bands were quantified with ImageGauge 4.0 (FujiFilm).

### Statistical analysis

Statistical significance was determined using a *t* test with OriginPro7 software (OriginLab Co.). *P* values < 0.05 were considered significant.

### Online supplemental material

Fig. S1 shows that absence of caveolin-1 does not delay cell spreading. Fig. S2 shows that constitutively active Rho and dominant-negative mutants of Rac and Cdc42 restore normal polarity in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts. Fig. S3 shows that a dominant-negative p190RhoGAP construct rescues polarity in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts. Fig. S4 demonstrates that Src inhibition and p190RhoGAP knockdown in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs restore the WT morphology pattern. Fig. S5 shows that total and tyrosine phosphorylated p190RhoGAP are elevated in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs. Video 1 shows adhesion turnover in WT MEFs. Video 2 shows adhesion turnover in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs. Video 3 shows protrusion-retraction analysis in WT MEFs. Video 4 shows protrusion-retraction analysis in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs. Video 5 displays random migration of WT MEFs. Video 6 demonstrates random migration of Cav1<sup>-/-</sup> MEFs. Video 7 shows random migration of Cav1<sup>-/-</sup> MEFs reconstituted with Cav1. Video 8 shows in vitro wound-healing assays in WT MEFs. Video 9 shows in vitro wound-healing assays in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs. Video 10 demonstrates in vitro wound-healing assays in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs reconstituted with Cav1. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200701006/DC1>.

We thank Michael P. Lisanti and Richard G.W. Anderson for MEFs and thymus fibroblasts from Cav1<sup>-/-</sup> and Cav1<sup>+/+</sup> littermate mice, respectively, and Keith Burridge for GFP-p190 R1283A. We are grateful to A. Cerezo, M. Guadamillas, and I. Flores for advice and assistance in in vivo wound-healing experiments; J.C. García (Research Computing, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares) for software assistance; and M.C. Montoya, A.G. Arroyo, and J.M. Redondo for critical reading of the manuscript.

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Education (grants SAF2005-00493 and GEN2003-20239-C06-04 to M.A. del Pozo), a predoctoral fellowship (BEF-2003-2712 to A. Grande-García), the Ramón y Cajal Program (to A. Echarri and M.A. del Pozo), and the European Union (Marie Curie International Reintegration grant MIRG-CT-2005-016427 to M.A. del Pozo). M.A. del Pozo is an EMBO Young Investigator and the recipient of an EURYI (European Young Investigator) award.

Submitted: 2 January 2007

Accepted: 23 April 2007

## References

- Arthur, W.T., and K. Burridge. 2001. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol. Biol. Cell.* 12:2711–2720.
- Arthur, W.T., L.A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 10:719–722.
- Beardsley, A., K. Fang, H. Mertz, V. Castranova, S. Friend, and J. Liu. 2005. Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J. Biol. Chem.* 280:3541–3547.
- Brouns, M.R., S.F. Matheson, and J. Settleman. 2001. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Biol.* 3:361–367.
- Burridge, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 116:167–179.
- Cao, H., W.E. Courchesne, and C.C. Mastick. 2002. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J. Biol. Chem.* 277:8771–8774.
- Carragher, N.O., and M.C. Frame. 2004. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.* 14:241–249.
- de Rooij, J., A. Kerstens, G. Danuser, M.A. Schwartz, and C.M. Waterman-Storer. 2005. Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering. *J. Cell Biol.* 171:153–164.
- del Pozo, M.A., M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, J.M. Serrador, and F. Sánchez-Madrid. 1999. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29:3609–3620.
- del Pozo, M.A., L.S. Price, N.B. Alderson, X.D. Ren, and M.A. Schwartz. 2000. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J.* 19:2008–2014.
- del Pozo, M.A., N. Balasubramanian, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, A. Grande-García, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol.* 7:901–908.
- DeMali, K.A., K. Wennerberg, and K. Burridge. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:572–582.
- Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohm, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F.C. Luft, et al. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 293:2449–2452.
- Fukuyama, T., H. Ogita, T. Kawakatsu, T. Fukuhara, T. Yamada, T. Sato, K. Shimizu, T. Nakamura, M. Matsuda, and Y. Takai. 2005. Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions. *J. Biol. Chem.* 280:815–825.
- Galvez, B.G., S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, M. Vicente-Manzanares, F. Sanchez-Madrid, and A.G. Arroyo. 2004. Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 15:678–687.
- Ge, S., and J.S. Pachter. 2004. Caveolin-1 knockdown by small interfering RNA suppresses responses to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 by human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279:6688–6695.
- Geiger, B., and A. Bershadsky. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:584–592.
- Glenney, J.R., and L. Zokas. 1989. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 108:2401–2408.
- Gonzalez, E., A. Nagiel, A.J. Lin, D.E. Golan, and T. Michel. 2004. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279:40659–40669.
- Hakak, Y., and G.S. Martin. 1999. Ubiquitin-dependent degradation of active Src. *Curr. Biol.* 9:1039–1042.
- Hassan, G.S., T.M. Williams, P.G. Frank, and M.P. Lisanti. 2006. Caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells show cell autonomous abnormalities in proliferation, migration, and endothelin-based signal transduction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290:H2393–H2401.
- Huttenlocher, A. 2005. Cell polarization mechanisms during directed cell migration. *Nat. Cell Biol.* 7:336–337.
- Isshiki, M., J. Ando, K. Yamamoto, T. Fujita, Y. Ying, and R.G. Anderson. 2002. Sites of Ca<sup>2+</sup> wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* 115:475–484.
- Kawakatsu, T., H. Ogita, T. Fukuhara, T. Fukuyama, Y. Minami, K. Shimizu, and Y. Takai. 2005. Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J. Biol. Chem.* 280:4940–4947.
- Kurokawa, K., and M. Matsuda. 2005. Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol. Biol. Cell.* 16:4294–4303.
- Le Lay, S., and T.V. Kurzchalia. 2005. Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim. Biophys. Acta.* 1746:322–333.
- Li, Z., M. Hannigan, Z. Mo, B. Liu, W. Lu, Y. Wu, A.V. Smrcka, G. Wu, L. Li, M. Liu, et al. 2003. Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell.* 114:215–227.
- Machesky, L.M., and A. Hall. 1997. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* 138:913–926.
- Meili, R., and R.A. Firtel. 2003. Two poles and a compass. *Cell.* 114:153–156.
- Meng, W., M. Numazaki, K. Takeuchi, Y. Uchibori, Y. Ando-Akatsuka, M. Tominaga, and T. Tominaga. 2004. DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src-dependent manner. *EMBO J.* 23:760–771.
- Miyamoto, Y., J. Yamauchi, and H. Itoh. 2003. Src kinase regulates the activation of a novel FGD-1-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor in the signaling pathway from the endothelin A receptor to JNK. *J. Biol. Chem.* 278:29890–29900.
- Navarro, A., B. Anand-Apte, and M.O. Parat. 2004. A role for caveolae in cell migration. *FASEB J.* 18:1801–1811.
- Nimnual, A.S., L.J. Taylor, and D. Bar-Sagi. 2003. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5:236–241.

- Nishiya, N., W.B. Kiosses, J. Han, and M.H. Ginsberg. 2005. An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat. Cell Biol.* 7:343–352.
- Noren, N.K., W.T. Arthur, and K. Burridge. 2003. Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J. Biol. Chem.* 278:13615–13618.
- Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 2005. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J. Cell Biol.* 170:793–802.
- Parat, M.O., B. Anand-Apte, and P.L. Fox. 2003. Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol. Biol. Cell.* 14:3156–3168.
- Parton, R.G., M. Hanzal-Bayer, and J.F. Hancock. 2006. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J. Cell Sci.* 119:787–796.
- Pear, W.S., J.P. Miller, L. Xu, J.C. Pui, B. Soffer, R.C. Quackenbush, A.M. Pendergast, R. Bronson, J.C. Aster, M.L. Scott, and D. Baltimore. 1998. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood.* 92:3780–3792.
- Pertz, O., L. Hodgson, R.L. Klemke, and K.M. Hahn. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature.* 440:1069–1072.
- Podar, K., R. Shringarpure, Y.T. Tai, M. Simoncini, M. Sattler, K. Ishitsuka, P.G. Richardson, T. Hideshima, D. Chauhan, and K.C. Anderson. 2004. Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Res.* 64:7500–7506.
- Radel, C., and V. Rizzo. 2005. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H936–H945.
- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* 265:23–32.
- Razani, B., J.A. Engelman, X.B. Wang, W. Schubert, X.L. Zhang, C.B. Marks, F. Macaluso, R.G. Russell, M. Li, R.G. Pestell, et al. 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276:38121–38138.
- Ren, X.D., W.B. Kiosses, D.J. Sieg, C.A. Otey, D.D. Schlaepfer, and M.A. Schwartz. 2000. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J. Cell Sci.* 113:3673–3678.
- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302:1704–1709.
- Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* 9:640–648.
- Sánchez-Madrid, F., and M.A. del Pozo. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18:501–511.
- Sander, E.E., J.P. ten Klooster, S. van Delft, R.A. van der Kammen, and J.G. Collard. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* 147:1009–1022.
- Servitja, J.M., M.J. Marinissen, A. Sodhi, X.R. Bustelo, and J.S. Gutkind. 2003. Rac1 function is required for Src-induced transformation: evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J. Biol. Chem.* 278:34339–34346.
- Shaul, P.W., and R.G. Anderson. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol.* 275:L843–L851.
- Sheetz, M.P., D. Felsenfeld, C.G. Galbraith, and D. Choquet. 1999. Cell migration as a five-step cycle. *Biochem. Soc. Symp.* 65:233–243.
- Singer, A.J., and R.A. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341:738–746.
- Sonveaux, P., P. Martinive, J. DeWever, Z. Batova, G. Daneau, M. Pelat, P. Ghisdal, V. Gregoire, C. Dessy, J.L. Balligand, and O. Feron. 2004. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ. Res.* 95:154–161.
- Stahlhut, M., and B. van Deurs. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* 11:325–337.
- Tu, S., W.J. Wu, J. Wang, and R.A. Cerione. 2003. Epidermal growth factor-dependent regulation of Cdc42 is mediated by the Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 278:49293–49300.
- Valasek, M.A., J. Weng, P.W. Shaul, R.G. Anderson, and J.J. Repa. 2005. Caveolin-1 is not required for murine intestinal cholesterol transport. *J. Biol. Chem.* 280:28103–28109.
- Vicente-Manzanares, M., D.J. Webb, and A.R. Horwitz. 2005. Cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* 118:4917–4919.
- Wary, K.K., A. Mariotti, C. Zurzolo, and F.G. Giancotti. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell.* 94:625–634.
- Wehrle-Haller, B., and B. Imhof. 2002. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol.* 12:382–389.
- Wei, Y., X. Yang, Q. Liu, J.A. Wilkins, and H.A. Chapman. 1999. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J. Cell Biol.* 144:1285–1294.
- Woodman, S.E., A.W. Ashton, W. Schubert, H. Lee, T.M. Williams, F.A. Medina, J.B. Wyckoff, T.P. Combs, and M.P. Lisanti. 2003. Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *Am. J. Pathol.* 162:2059–2068.
- Xu, J., F. Wang, A. Van Keymeulen, P. Herzmark, A. Straight, K. Kelly, Y. Takuwa, N. Sugimoto, T. Mitchison, and H.R. Bourne. 2003. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell.* 114:201–214.
- Zhang, W., B. Razani, Y. Altschuler, B. Bouzahzah, K.E. Mostov, R.G. Pestell, and M.P. Lisanti. 2000. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 275:20717–20725.



# Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization

Miguel A. del Pozo<sup>1,5</sup>, Nagaraj Balasubramanian<sup>2</sup>, Nazilla B. Alderson<sup>1</sup>, William B. Kiosses<sup>3</sup>, Araceli Grande-García<sup>1</sup>, Richard G. W. Anderson<sup>4</sup> and Martin A. Schwartz<sup>2</sup>

**Growth of normal cells is anchorage dependent because signalling through multiple pathways including Erk, phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI(3)K) and Rac requires integrin-mediated cell adhesion<sup>1</sup>. Components of these pathways localize to low-density, cholesterol-rich domains in the plasma membrane named 'lipid rafts'<sup>2,3</sup> or 'cholesterol-enriched membrane microdomains' (CEMM)<sup>4</sup>. We previously reported that integrin-mediated adhesion regulates CEMM transport such that cell detachment from the extracellular matrix triggers CEMM internalization and clearance from the plasma membrane<sup>5</sup>. We now report that this internalization is mediated by dynamin-2 and caveolin-1. Internalization requires phosphorylation of caveolin-1 on Tyr 14. A shift in localization of phospho-caveolin-1 from focal adhesions to caveolae induces CEMM internalization upon cell detachment, which mediates inhibition of Erk, PI(3)K and Rac. These data define a novel molecular mechanism for growth and tumour suppression by caveolin-1.**

Loss of anchorage dependence of growth *in vitro* is closely associated with tumour growth and metastasis *in vivo*<sup>1</sup>. The effects of integrins on multiple growth regulatory pathways mediate anchorage dependence. Conversely, anchorage independence in cancer cells is due to constitutive activation of these pathways such that integrin-mediated adhesion is no longer required for signalling. For the small GTPase Rac, a key anchorage-dependent event is translocation of activated protein to the plasma membrane, which is essential for activation of downstream effectors<sup>6</sup>. Regulation by integrins occurs through internalization of CEMM, which contain Rac plasma-membrane-binding sites<sup>5</sup>. Internalized CEMM markers include cholesterol, glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and GM1, for which approximately 90% was lost from the cell surface<sup>5</sup>.

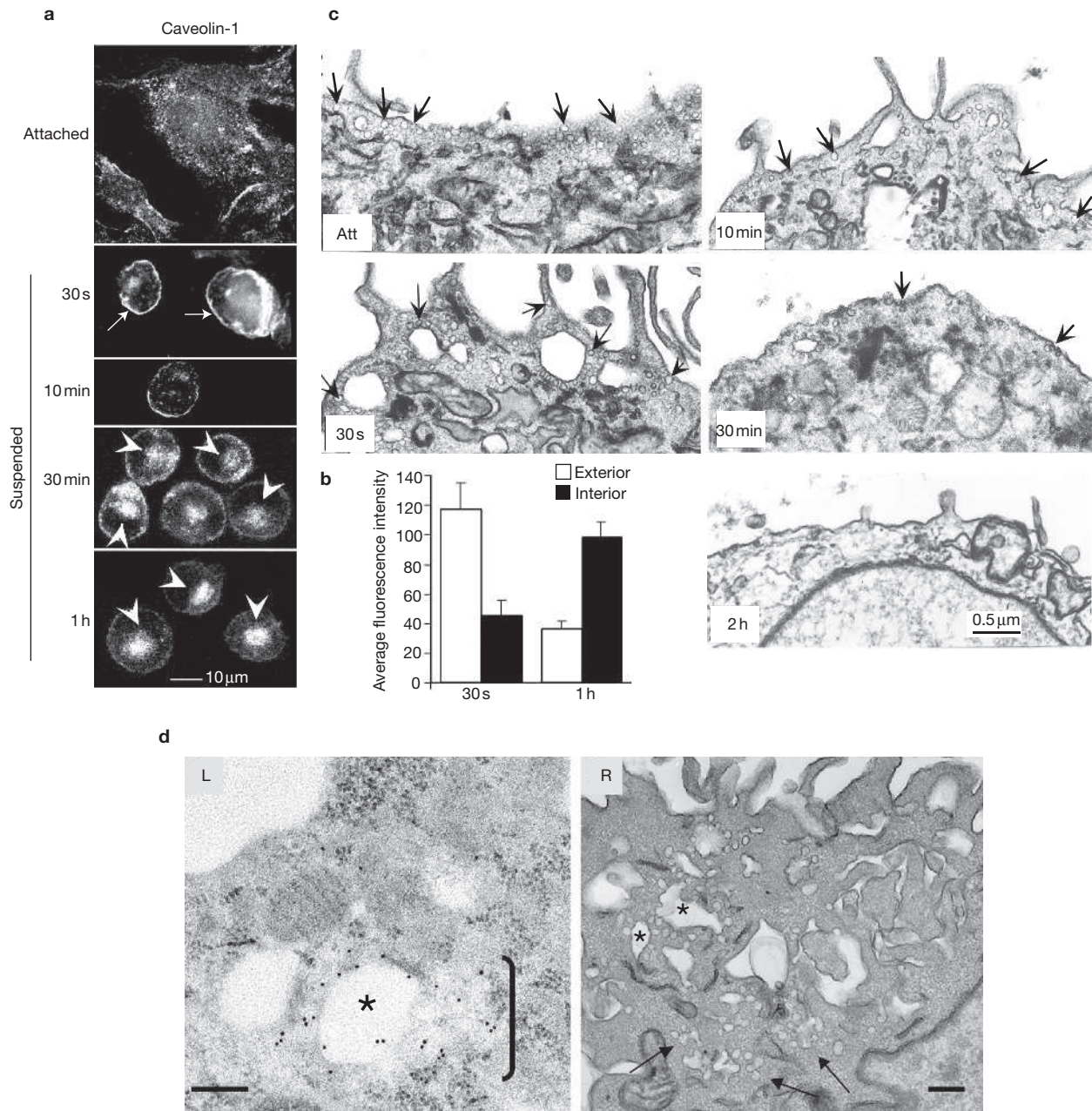
The best defined subtype of CEMM is caveolae, which contain caveolin-1, or in muscle, caveolin-3 (ref. 7). Caveolae are ~100-nm invaginations of the plasma membrane that are involved in clathrin-independent

membrane transport<sup>8</sup> and intracellular cholesterol transport<sup>9</sup>. Caveolin is a protein with relative molecular mass 21,000 ( $M_r$  21K) and was first identified as a substrate for the v-src tyrosine kinase, which, among several other kinases, phosphorylates caveolin on Tyr 14 (refs 10, 11). Caveolin is also implicated in modulation of signal transduction. Caveolin inhibits a number of enzymes<sup>11,12</sup> and has been identified as a candidate tumour suppressor<sup>13–16</sup>. Many tumour cells show loss of caveolin expression, and its re-expression reverses anchorage-independent growth<sup>12</sup>. Sixteen per cent of human breast cancers contain a caveolin mutation<sup>17</sup> and caveolin-knockout mice show marked acceleration of tumorigenesis in response to carcinogenic stimuli<sup>15,16</sup>.

Caveolin is involved in internalization of GM1 (ref. 8). We therefore investigated the role of caveolin in CEMM internalization in anchorage-dependent cells after integrin signalling was inactivated by detaching cells from the extracellular matrix (ECM)<sup>1</sup>. When cells were detached, caveolin-1 showed time-dependent movement from the plasma membrane to an intracellular compartment (Fig. 1a; results quantified in 1b) on the same timescale as the raft marker GM1 (ref. 5). This result is consistent with published studies showing that internalized caveolin concentrates in a central region of the cell<sup>18</sup>. Electron microscopy revealed flask-shaped caveolae in the plasma membrane immediately after detachment, but these decreased at later times (Fig. 1c). Quantification of caveolae confirmed this observation (47.5 caveolae per  $\mu\text{m}$  of membrane at 30 s; 12.9 at 2 h after detachment. Total lengths of membrane examined were 29.9 and 29.5  $\mu\text{m}$ , respectively). Immunogold labelling of caveolin-1 in cells shortly after detachment revealed large vacuoles surrounded by invaginated caveolae (Fig. 1d), though these were much less evident at later times (data not shown). Similar structures have been previously reported<sup>8</sup>. These results suggest that detachment causes the formation of caveolae-rich membrane internalization structures. When serum starved, adherent cells were double labelled and caveolin-1 and GM1 were found to significantly colocalize at cell edges (Fig. 2a). Colocalization was similar immediately after detachment (Fig. 2a; quantified in 2b) and then increased between 2 and 10 min after loss of adhesion (Fig. 2a), coinciding with internalization of both GM1 (ref. 5) and

<sup>1</sup>Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid 28029, Spain. <sup>2</sup>Departments of Microbiology and Biomedical Engineering, Mellon Prostate Cancer Research Institute and Cardiovascular Research Center, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908, USA. <sup>3</sup>Microscopy Facility, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA. <sup>4</sup>Department of Cell Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75235, USA.

<sup>5</sup>Correspondence should be addressed to M.A.d.P. (e-mail: madelpozo@cnic.es)

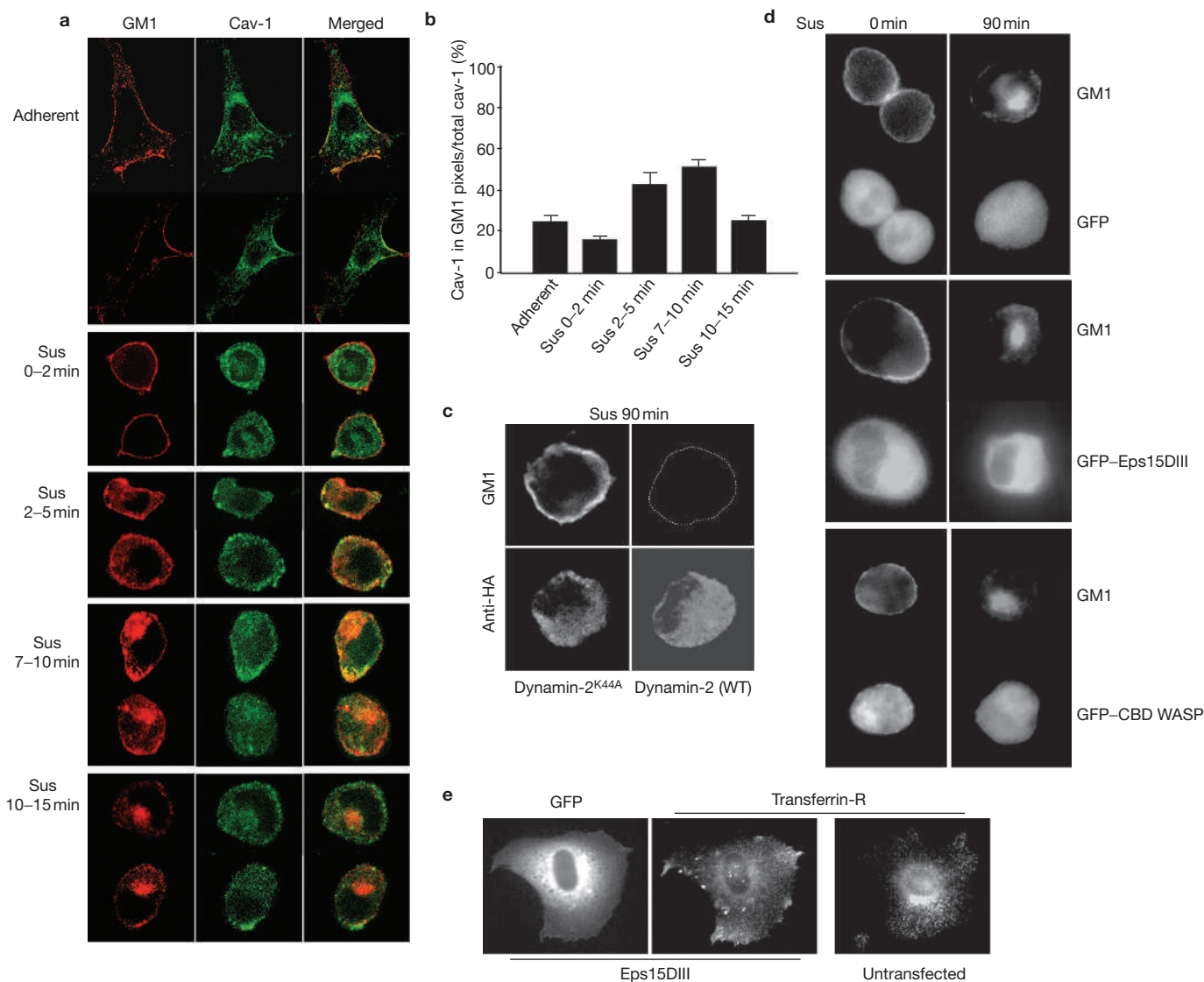


**Figure 1** Caveolin-1 internalization. (a) Attached NIH-3T3 cells or cells suspended for the indicated times were fixed, permeabilized and stained for caveolin-1. Cell surface (arrows) versus intracellular (arrowheads) staining is indicated. (b) Internalization of caveolin in images from a was quantified as described in Methods. Caveolin fluorescence within 3.5  $\mu\text{m}$  of the cell surface is considered exterior; fluorescence internal to this zone, further from the plasma membrane, is considered interior. Values are means  $\pm$  s.e.m. from 10 cells in three independent experiments. Differences between 30 s and 1 h are statistically significant ( $P < 2.5 \times 10^{-4}$  for the interior region and  $P < 7 \times 10^{-3}$  for the exterior). (c) Attached cells (Att) or cells suspended for the indicated times were fixed and processed for electron microscopy

to detect caveolae in the plasma membrane. Caveolae are indicated by arrows. Images are representative of areas within cells where caveolae are concentrated. (d) Cells suspended for 2 min were fixed and processed for either immunogold labelling of caveolin-1 (left; L) or electron microscopy (right; R). Left: a region of caveolae internalization showing a vacuole (asterisk) surrounded by multiple  $\alpha$ -cav-1 IgG gold particles. To the right of this vacuole (bracket) is a cluster of caveolae emanating from the vacuole. Right: a similar region of a cell processed for regular TEM microscopy. This image shows several caveolae-rich vacuoles (asterisks) and associated clusters of caveolae and caveolae-derived vesicles (arrows). Scale bars, 0.2  $\mu\text{m}$ . ( $n = 3$ ).

caveolin-1 (Fig. 1a). Colocalization of caveolin-1 with GM1 decreased at later times (Fig. 2a, b), suggesting that GM1 is internalized through caveolae and is then transported to a caveolin-1-negative compartment. Thus, detachment induces internalization of both GM1 and caveolae, suggesting that GM1 internalization might occur through a caveolin-1-dependent endocytic pathway.

Basal GM1 internalization proceeds via clathrin-dependent, caveolin-1-dependent, and clathrin- and caveolin-1-independent pathways<sup>8</sup>. We therefore characterized the endocytic machinery involved in this integrin-regulated process. Detachment-induced GM1 internalization was completely abolished in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) expressing a dominant-negative dynamin-2 mutant (Fig. 2c), but not



**Figure 2** Pathway of integrin-regulated GM1 internalization. (a) Serum-deprived NIH-3T3 fibroblasts were surface labelled on ice with CTxB-Alexa 568, detached and held in suspension (Sus) for the indicated times, or plated on fibronectin for 2 h (adherent). Cells were then fixed and stained for caveolin-1 in green. Cells shown are observed at the equatorial plane and representative of up to 50 cells at each time point. (b) To quantify colocalization between GM1 and caveolin, pixels that were positive for GM1 stain were identified and the fraction of the caveolin-1 stain within these zones calculated. Values are means  $\pm$  s.e.m. from three independent

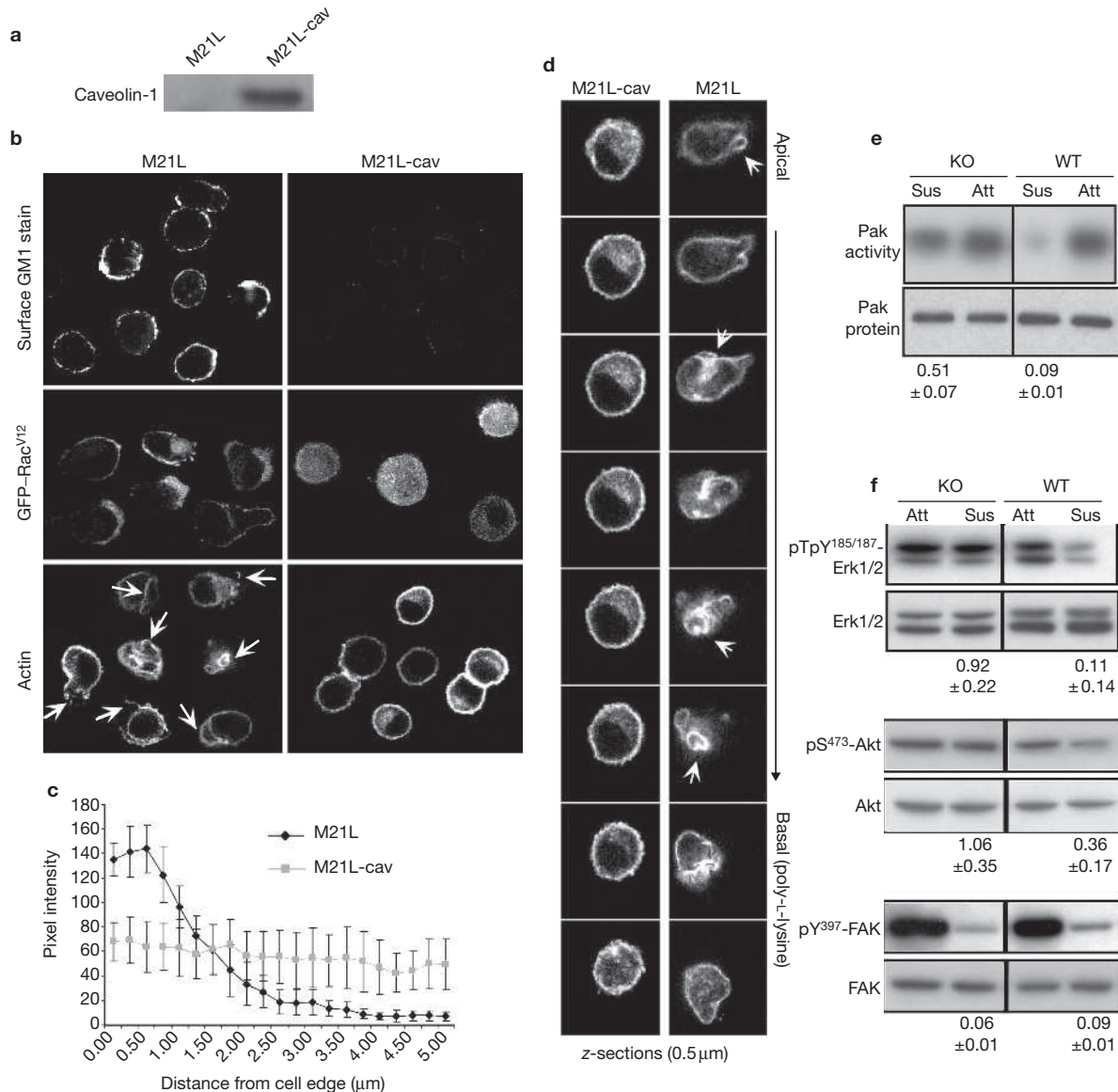
experiments. (c) Wild-type MEFs expressing HA-tagged dominant-negative (K44A) or wild-type (WT) dynamin-2 were held in suspension for 90 min, surface labelled with Alexa 488-CTxB, and then stained with anti-HA antibody. (d) Wild-type MEFs expressing GFP alone, GFP-tagged Eps15DIII, or the Cdc42-binding domain (CBD) of WASP were surface labelled with Alexa 568-CTB, then detached and held in suspension for the indicated times. (e) Control and GFP-tagged Eps15DIII expressing wild-type MEFs adherent on fibronectin were stained for the transferrin receptor (transferrin-R). Cells shown are representative of three independent experiments.

in MEFs expressing the carboxy-terminal domain of Eps15, a selective inhibitor of the classic clathrin pathway<sup>8,19,20</sup> (Fig. 2d; middle panels). This construct was functional, as it inhibited transferrin receptor internalization in a parallel assay (Fig. 2e). There is also dynamin-independent, Cdc42-dependent internalization of GPI-anchored proteins<sup>19</sup>. However, inhibition of Cdc42 with either the Cdc42-binding domain (CBD) of WASP (Fig. 2d; bottom panels) or Cdc42<sup>T17N</sup> (data not shown) had no effect. These results show that GM1 internalization after detachment is independent of clathrin and Cdc42, but requires dynamin-2.

Because dynamin also mediates caveolin-dependent internalization<sup>8</sup>, these results suggested that caveolin-1 could be involved. To address the requirement for caveolin, tumour lines were screened for caveolin-1

expression. M21L melanoma cells were found to contain no detectable caveolin-1 (Fig. 3a), -2, or -3 (data not shown). M21L-cav cells, in which caveolin-1 was stably expressed, were then generated. M21L cells with and without caveolin showed similar morphology, GM1 surface staining and Rac association with membranes when adherent (see Supplementary Information, Fig. S1a-c). After detachment, M21L-cav cells resembled NIH-3T3 cells in that GM1 was cleared from the cell surface (Fig. 3b; top panels). M21L cells, however, retained surface GM1 even after extended incubation in suspension. The two lines had similar intensity of staining after permeabilization (data not shown) and similar levels of total GM1 (see Supplementary Information, Fig. S1b). Thus, GM1 internalization also requires caveolin.





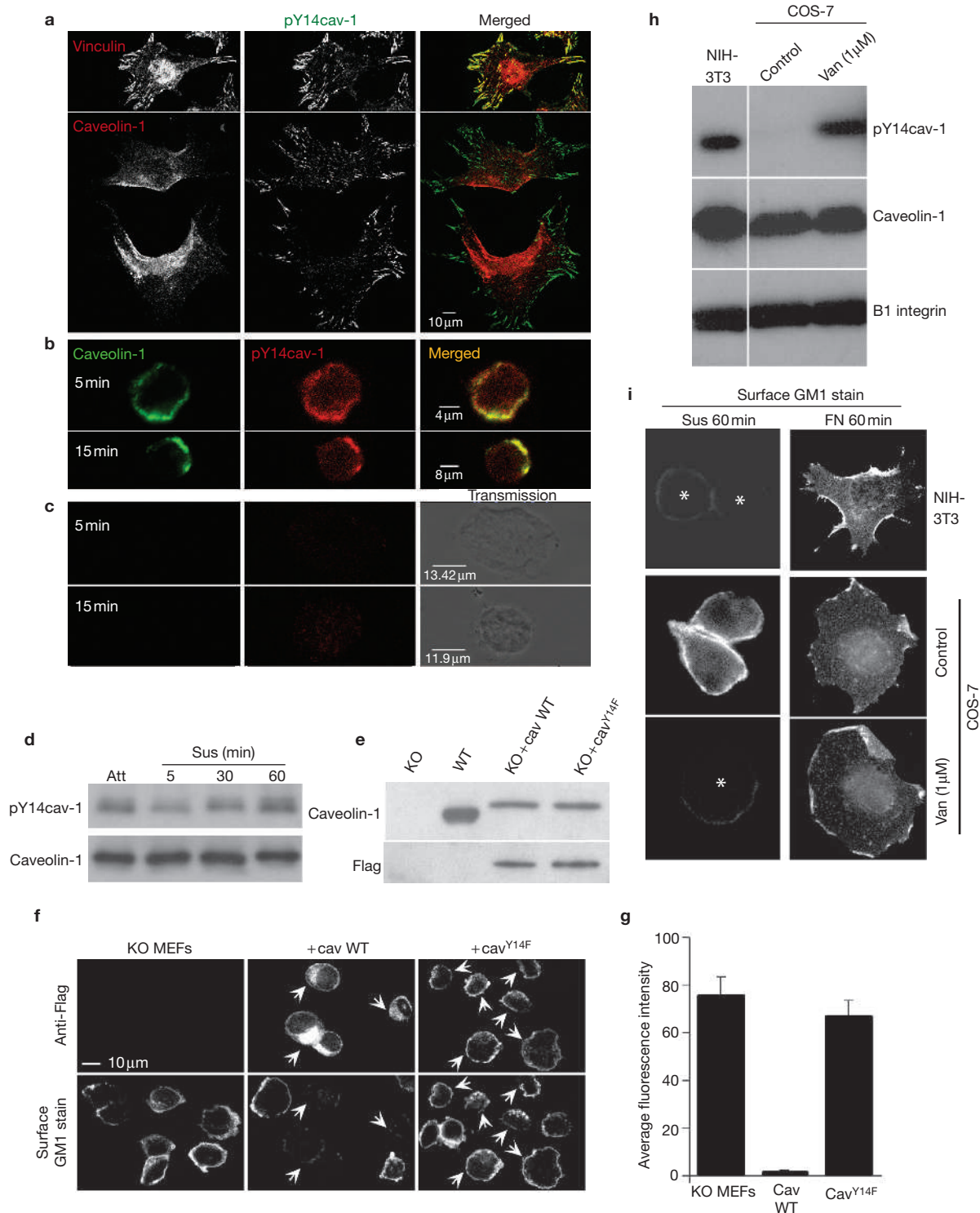
**Figure 3** Requirement for caveolin-1. **(a)** Lysates from M21L melanoma or M21L-cav cells were analysed by western blotting with anti-caveolin polyclonal antibody. **(b)** Top panels: cells detached for 2 h were stained live with FITC-CTxB to label surface GM1. Middle panels: cells expressing GFP-Rac<sup>G12V</sup>. Bottom panels: cells stained with rhodamine-phalloidin. Arrows indicate protrusions and ruffle-like structures. **(c)** GFP-Rac<sup>G12V</sup> localization to the membrane in **b** was assessed by measuring pixel intensity starting at the cell edge. Values are means  $\pm$  s.e.m. **(d)** Confocal z-section series of actin-stained cells. Arrows, as in **b**. **(e)** Serum-starved *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs (KO) or

*Cav1*<sup>+/+</sup> MEFs (WT), attached or suspended for 2 h, were stimulated with 10% serum for 10 min, and Pak kinase activity assayed. **(f)** *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs (KO) or *Cav1*<sup>+/+</sup> MEFs (WT) were kept adherent or suspended for 8 h in the presence of 10% serum. Cell lysates were analysed by western blotting with phospho-specific antibodies to Erk1/2, Akt and FAK, or with phospho-independent antibodies to the same proteins for normalization. Values in **e** and **f** are means  $\pm$  s.d. of the specific enzymatic activity (kinase activity or amount of phospho-protein normalized to total protein) in non-adherent cells normalized to that of adherent cells ( $n = 4$ ).

Internalization of CEMM in suspended cells led to loss of GTP-Rac membrane binding and thus blocked its interaction with effectors<sup>5</sup>. We therefore examined the behaviour of Rac<sup>G12V</sup>. Non-adherent M21L cells retained green fluorescent protein (GFP)-tagged Rac<sup>G12V</sup> membrane localization, whereas Rac was mainly cytoplasmic in suspended M21L-cav cells (Fig. 3b; middle panels). We confirmed this result by measuring pixel intensity of GFP-Rac<sup>G12V</sup> at cell edges (Fig. 3c) and by biochemical fractionation (see Supplementary Information, Fig. S1c). To test Rac effector function, we examined F-actin organization after detachment. Non-adherent M21L cells exhibited asymmetric shapes and F-actin-rich protrusions resembling ruffles (Fig 3b; bottom panels), which are shown

more clearly in serial sections (Fig. 3d). These structures were abolished by Rac<sup>T17N</sup> (see Supplementary Information, Fig. S1d), demonstrating that they are Rac dependent. In contrast, M21L-cav cells in suspension were completely round with no surface protrusions (Fig. 3b, d).

To confirm these results, we examined fibroblasts from *Cav1*<sup>-/-</sup> and *Cav1*<sup>+/+</sup> littermate mice<sup>21</sup>. These cells showed similar surface staining with CTxB when adherent (data not shown); however, detachment triggered loss of cell surface GM1 in *Cav1*<sup>+/+</sup> (data not shown) but not in *Cav1*<sup>-/-</sup> fibroblasts (Fig. 4f). Transient transfection with caveolin-1 (western blot in Fig. 4e) restored the internalization of GM1 after detachment (Fig 4f; quantified in 4g). *Cav1*<sup>-/-</sup> fibroblasts also retained GTP-Rac membrane



**Figure 4** Phospho-caveolin-1 mediates integrin-dependent membrane domain internalization. (**a**) Adherent NIH-3T3 cells were doubly stained for phospho-caveolin-1 (pY14cav-1) plus either vinculin or total caveolin-1. Wild-type MEFs (**b**) or *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs (**c**) in suspension were stained for total caveolin-1 plus pY14cav-1. (**d**) NIH-3T3 cells were kept adherent (Att) or placed in suspension (sus) for the indicated times. Cell lysates were analysed by western blotting with anti-caveolin-1 or anti-pY14cav-1 (*n* = 10). (**e**) Western blotting for caveolin-1 and Flag in *Cav1*<sup>+/+</sup> MEFs (WT), *Cav1*<sup>-/-</sup> MEFs (KO) and KO MEFs transiently transfected with Flag-tagged wild-type or caveolin-1<sup>Y14F</sup>. (**f**) Caveolin-null MEFs transiently transfected with wild-type or caveolin-1<sup>Y14F</sup> were detached for 2 h and stained live with FITC-CTxB to label surface GM1, then fixed and stained with anti-Flag monoclonal

antibody to detect caveolin expression. Arrows denote transfected cells. Images are single confocal sections (*n* = 4). (**g**) Quantification of surface GM1. The level of surface GM1 was quantified by measuring total staining intensity of suspended, surface CTxB-labelled untransfected caveolin-null cells and cells expressing wild-type or caveolin-1<sup>Y14F</sup> from **f**. Values are means ± s.e.m. from 10 cells in four independent experiments. (**h**) NIH-3T3 cells, untreated COS-7 cells, and COS-7 cells incubated with 1 μM sodium pervanadate (Van) for 1 h were lysed, and analysed by western blotting with antibodies against caveolin-1, pY14cav-1 and β1 integrin. (**i**) Adherent and suspended cells treated as in **h** were surface labelled with CTxB-Alexa 568. Asterisks denote cells not readily visible due to low surface labelling. Results are representative of three independent experiments.

localization and showed actin-rich protrusions in suspension, which were lost after transfection of caveolin (data not shown). As an additional assay for Rac function, activation of its effector, Pak, was assayed. As observed previously, Pak kinase activity was strongly downregulated in suspended wild-type fibroblasts whereas suspended *Cav*<sup>-/-</sup> cells retained Pak kinase activity (Fig. 3e). Thus, caveolin is required for internalization of GM1, loss of Rac membrane targeting and subsequent effector interactions upon loss of cell adhesion.

Integrin-mediated adhesion regulates other signalling pathways, including Ras–Erk, FAK and PI(3)K–Akt<sup>1</sup>. To test whether loss of plasma membrane microdomains influences these pathways, we measured the effect of adhesion in wild-type and *Cav*<sup>-/-</sup> MEFs. Both Erk and Akt were strongly downregulated in non-adherent wild-type MEFs, whereas activity was retained in suspended *Cav*<sup>-/-</sup> cells (Fig. 3f). By contrast, FAK activity was adhesion-dependent in all cases (Fig. 3f). Thus, caveolin is essential for anchorage dependence of several growth regulatory pathways, but not FAK.

Caveolin-1 is phosphorylated on Tyr 14 (refs 10, 11) and tyrosine-phosphorylated caveolin-1 (pY14cav-1) is present in focal adhesions<sup>11,22</sup>. Indeed, phospho-caveolin-1 strongly colocalized with vinculin at focal adhesions and was virtually absent from caveolae marked by caveolin-1 staining in both NIH-3T3 cells (Fig. 4a) and wild-type MEFs (data not shown). Although localization of caveolin-1 to focal adhesions has been previously reported<sup>23</sup>, the observed weak staining of focal adhesions with the caveolin-1 antibody suggests that the stoichiometry of caveolin-1 phosphorylation is low. Indeed, western blot densitometry analysis of 1 mM vanadate-treated and control NIH-3T3 cells revealed that less than 1% caveolin-1 is phosphorylated on Tyr 14 (see Supplementary Information, Fig. S2). When cells were detached, phosphorylated caveolin-1 became dispersed throughout the plasma membrane where it showed nearly complete colocalization with caveolin-1, in both wild-type MEFs (Fig. 4b) and NIH-3T3 cells (see Supplementary Information, Fig. S3). Colocalization was also observed at later times after detachment in interior regions of the cell (data not shown). The phospho-caveolin-1 antibody showed no staining in detached caveolin-1-deficient MEFs (Fig. 4c), supporting the specificity of the staining pattern. When Triton X-100 extracts were run on sucrose gradients, phospho-caveolin-1 was primarily in the heavy fractions in adherent cells (73 ± 5%) but shifted to the light fractions after detachment (72 ± 7%), consistent with its movement into caveolae. Caveolin Y14 phosphorylation decreased slightly after detachment but this effect was transient and levels recovered after 30–60 min (Fig. 4d). Altogether, these results reveal an increase in caveolae-localized pY14cav-1 upon cell detachment.

Previous studies have linked caveolin phosphorylation to internalization<sup>8,24,25</sup>. To test whether caveolin Y14 phosphorylation is required for raft internalization after detachment, *Cav*<sup>-/-</sup> cells were transfected with caveolin<sup>Y14F</sup> (Fig. 4e). Expressing cells showed normal levels and cellular distribution of GM1 when adherent (data not shown), but in contrast to wild-type caveolin, detachment failed to trigger internalization (Fig. 4f; CTxB surface stain quantified in Fig. 4g). The mutant caveolin<sup>Y14F</sup> induced normal caveolae in *Cav*<sup>-/-</sup> cells (see Supplementary Information, Fig. S4), demonstrating its functionality. *Cav*<sup>Y14F</sup> cells also retained Rac membrane localization and actin-rich membrane protrusions in suspension (data not shown; but note morphology in Fig. 4f). Thus, tyrosine-phosphorylated caveolin is required for raft internalization and Rac inhibition induced by detachment from the extracellular matrix.

Studies in COS-7 cells further support this conclusion. These cells showed negligible levels of pY14cav-1 (Fig. 4h) and did not internalize GM1 upon cell detachment (Fig. 4i). Treatment with a low dose (1 μM) of vanadate induced caveolin Y14 phosphorylation to a level similar to in 3T3 cells (Fig. 4h). This treatment did not alter GM1 localization in adherent cells but allowed GM1 internalization after detachment (Fig. 4i). These results support the hypothesis that pY14cav-1 is required for CEMM internalization specifically upon loss of cell adhesion.

These data support a model in which, when phospho-caveolin is present in cells at significant levels, it is retained in focal adhesions to prevent internalization. Cell detachment triggers a shift in phospho-caveolin localization to caveolae, which induces clearance of CEMM and caveolae from the cell surface. Our previous work<sup>5</sup> and the current results suggest that depletion of CEMM from the plasma membrane upon loss of adhesion prevents the activation of multiple signalling pathways required for cell proliferation.

We found previously that the association of Rac with the plasma membrane and activation of effectors downstream of Rac required membrane-binding sites that are controlled by integrin-mediated cell adhesion<sup>6</sup>. These binding sites are within CEMM, which are largely cleared from the plasma membrane by internalization following detachment from the ECM<sup>5</sup>. The present data show first that integrin-regulated CEMM internalization requires caveolin. In the absence of caveolin, the raft marker GM1 remains on the surface of detached cells, and Rac, Erk and Akt function lose their adhesion dependence. The transient colocalization of GM1 and caveolin after detachment suggests that internalization of GM1 proceeds through stimulation of a caveolar endocytosis pathway. Although basal GM1 internalization proceeds via clathrin-dependent, caveolae-dependent and other endocytic pathways<sup>8,20</sup>, our data suggest that internalization induced by detachment is primarily caveolar. Stimulated raft internalization in other systems also favours the caveolar route<sup>8</sup>. The observed physical association of integrins with caveolin<sup>26</sup> may be related to these regulatory events.

Second, although caveolin phosphorylation induces internalization<sup>8,24,25</sup>, integrins can inhibit CEMM internalization by retaining phospho-caveolin in focal adhesions. Phospho-caveolin may, however, have additional functions within the focal adhesions, the elucidation of which will be an interesting direction for future work. Detachment from the ECM results in phospho-caveolin localization to other sites in the plasma membrane where it induces internalization of CEMM via caveolae. Thus, loss of caveolin phosphorylation blocks CEMM internalization as effectively as complete loss of caveolin. Redistribution of pY14cav-1 may be due to its release from focal adhesions and diffusion to caveolae, and/or to changes in activity or localization of caveolin-1 kinases or phosphatases.

Palazzo *et al.* have implicated integrins and FAK in regulation of GM1-rich domains<sup>27</sup>; however, in their system other lipid raft markers such as GPI-linked proteins were unaffected. We find that *FAK*<sup>-/-</sup> fibroblasts show normal localization of phospho-caveolin-1 to focal adhesions and normal integrin-dependent internalization of GPI-linked proteins (data not shown). Thus, FAK and caveolin-1 seem to mediate two distinct mechanisms of integrin regulation of membrane domains.

In summary, we propose that integrin-mediated adhesion governs the presence of CEMM on the plasma membrane by regulating internalization through a caveolin-dependent pathway involving changes in phospho-caveolin localization. Caveolin is often mutated in breast cancer<sup>17</sup>.



Caveolin-1-null cells show hyperproliferation<sup>21,28</sup>, *Cav1*<sup>-/-</sup> knockout mice show hypertrophy and hyperplasia in several tissues<sup>17,21,28</sup>, and loss of caveolin-1 accelerates tumorigenesis<sup>15,16</sup>. Whereas caveolin seems to inhibit some signalling pathways by direct inhibition of signalling enzymes<sup>11,12</sup>, our data, which suggest that caveolin-1 is required for CEMM internalization, provide a novel mechanism for suppression of anchorage-independent cell growth by caveolin-1. However, positive effects on cell growth by caveolin-1 have also been described<sup>26</sup>. Whereas caveolin-1 behaves as a tumour suppressor in small-cell lung cancers, it promotes survival and growth in non-small-cell lung cancers<sup>29</sup>. Thus, caveolin seems to have multiple effects on growth regulatory pathways that show cell-type specificity; the mechanism described in this paper is likely to apply in cell types in which caveolin-1 suppresses anchorage-independent cell growth. Elucidating the role of caveolin phosphorylation and localization in tumorigenesis is therefore an important goal for future work.

## METHODS

**Cell culture and transfections.** NIH-3T3 cells were cultured as described<sup>5</sup>. M21L melanoma cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. MEFs from *Cav1*<sup>-/-</sup> and *Cav1*<sup>+/-</sup> littermate mice<sup>21</sup> were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine, penicillin and streptomycin. Cells were starved, suspended and transfected as described<sup>5</sup>. M21L cells stably expressing pCDNA3-caveolin-1(1-178)-Myc were selected by growth in Geneticin (Gibco, Gaithersburg, MD). Transfected cells were screened for protein expression by western blotting with polyclonal anti-caveolin-1 antibody (BD Transduction Labs, San Diego, CA), monoclonal anti-Myc 9E10 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or anti-Flag M2 monoclonal antibody (Sigma, St Louis, MO).

**DNA plasmids and constructs.** Plasmids encoding GFP-tagged Rac<sup>T17N</sup>, Rac<sup>G12V</sup> and Myc-tagged caveolin-1 were described previously<sup>5,30</sup>. A plasmid encoding Flag-tagged wild-type caveolin-1 and caveolin-1<sup>Y14F</sup> were obtained from C. C. Mastick<sup>10</sup> and subcloned into pCDNA-3. The proper orientation and sequence were verified by sequencing. DNA for transfections was purified by the CsCl gradient method. Dynamin-2 constructs were from S. Schmid (Scripps) and Eps15DIII was from D. Castle (University of Virginia).

**Electron microscopy and immunogold labelling of caveolin-1.** Adherent or suspended cells were fixed with 2% glutaraldehyde (EM Sciences, Ft. Washington, PA) in PBS at room temperature for 1 h, post-fixed with 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) in PBS for 1 h, and either embedded in Epon, sectioned and viewed with a JEOL 1200EX or processed for immunogold labelling of caveolin-1 following embedding in Lowicryl K4M as described<sup>30</sup>.

**Immunofluorescence and confocal microscopy.** Glass coverslips in 24-well plastic dishes were coated with 20 µg ml<sup>-1</sup> human fibronectin or 1 mg ml<sup>-1</sup> poly-L-lysine at 4 °C overnight. They were washed three times with PBS, and those coated with fibronectin were blocked with 10 mg ml<sup>-1</sup> heat-denatured BSA. Live staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)- or biotinylated CTxB (1–10 µg ml<sup>-1</sup>) was performed at 4 °C for 30 min. Rhodamine (TRITC)-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was used to detect biotin. Cells placed in suspension were then attached to poly-L-lysine-coated coverslips. Cells were fixed with 2% formaldehyde-PBS for 20 min at 4 °C, permeabilized in 0.2% cold Triton X-100 in PBS for 5 min, and blocked with 10% normal goat serum prior to staining. A polyclonal antibody to vinculin (sc-5573; Santa Cruz Biotechnology) followed by Texas-Red-conjugated anti-rabbit-IgG (Jackson ImmunoResearch) was used to stain focal adhesions. Images at the basal z-section of the cells, close to the substrate, were acquired using a Bio-Rad (Hercules, CA) 1024 MRC laser scanning confocal imaging system. Anti-transferrin receptor H68.4 monoclonal antibody (ATCC) was provided by D. Castle (University of Virginia). Double caveolin-1/pY14cav-1 staining was performed using a rabbit polyclonal antibody anti-caveolin-1 (BD Transduction Labs) followed by an Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody (Molecular Probes, Eugene, OR) and a mouse anti-pY14cav-1 (BD Transduction Labs) followed by a Rhodamine Red X-conjugated goat anti-mouse polyclonal antibody (Molecular

Probes). Samples were examined with an ultra-spectral confocal microscopy system (Leica TCSSP2-AOBS-UV, Leica-Microsystems, Wetzlar, Germany).

**Pak kinase assays.** Pak was precipitated from cell lysates with polyclonal anti-Pak1 antibody and kinase activity was determined using an in-gel kinase assay with myelin basic protein as a substrate, as described<sup>6</sup>. Pak protein in the precipitates was determined by western blotting with the same antibody. Autoradiographs were quantified by scanning densitometry and the specific activity (kinase activity normalized to Pak protein) was calculated.

**Immunoblot analysis of GM1 and phosphorylation of caveolin, Erk, Akt and FAK.** Adherent or suspended cells were washed with cold PBS and lysed with RIPA buffer plus protease and phosphatase inhibitors (20 mM Tris pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM EGTA, 10 µg ml<sup>-1</sup> each of aprotinin and leupeptin, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 3 mM β-glycerophosphate). Protein concentrations were quantified using the BCA reagent (Pierce, Rockford, IL). Equal amounts of samples were analysed by western blotting with a phospho-caveolin-1 (p-Tyr 14) monoclonal antibody (BD Transduction Labs) and a polyclonal antibody to caveolin-1. For analysis of surface GM1, M21L and M21L-cav cells were washed with cold PBS, incubated live with 10 µg ml<sup>-1</sup> CTxB (Calbiochem, La Jolla, CA) at 4 °C for 30 min, then washed with cold PBS and lysed. Equal amounts of samples were analysed by western blotting. CTxB (M<sub>r</sub> 55K) binding to the cell surface was detected with the goat polyclonal antibody anti-CTxB (Calbiochem, San Diego, CA), quantified by scanning densitometry and normalized to the levels of β1 integrin in the same samples. For analysis of total GM1 (M<sub>r</sub> 1.5K), equal amounts of M21L and M21L-cav cell lysates were analysed by western blotting with HRP-conjugated CTxB (Sigma). Quantification and normalization to the levels of β1 integrin was performed as above. To measure activation of integrin-dependent signalling pathways, cell lysates were prepared in the presence of phosphatase inhibitors and analysed by western blot with the following phosphorylation-site-specific rabbit polyclonal antibodies: anti-pTyr185/187-Erk1/2, anti-pS473-Akt and anti-pY397-FAK (all from Biosource, Camarillo, CA). Blots were then stripped and immunoblotted with phospho-independent antibodies to these proteins, namely anti-Erk1/2 polyclonal antibody (Biosource), anti-Akt polyclonal antibody (Cell Signaling, Beverly, MA) and anti-FAK monoclonal antibody (BD Transduction Labs). Bands were quantified by scanning densitometry, and the relative amounts of phosphorylated proteins determined.

**Binding of beads.** Polystyrene divinylbenzene beads (5 µm) (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA) were prepared by washing and incubating with 10 µg ml<sup>-1</sup> fibronectin at 4 °C overnight, washed with cold PBS and resuspended by sonication in an ultrasonic bath (Laboratory Supplies Co Inc, Hicksville, NY). Cells were incubated for different times with coated beads at a cell-to-bead ratio of 1:40.

**Pixel intensity profile from cell edge.** Confocal images of cells expressing GFP-Rac<sup>G12V</sup> were imported into ISEE software. The signal intensity was determined in 5-µm lines from the cell edge towards the cell centre. Average intensity profiles were calculated from 25 regions per cell in five different cells per condition.

**Colocalization and distribution of CTxB.** Cells were labelled with CTxB-Alexa 568 (Molecular Probes) at 10 µg ml<sup>-1</sup> for 30 min on ice, then kept adherent or placed in suspension and fixed at different times as indicated. Cells were then stained for caveolin-1, followed by anti-mouse Alexa 488 antibody (Molecular Probes). Images were obtained with a BIORAD 1024 scanning laser confocal microscope, then imported into Inovision ISEE software, or alternatively recorded with a Zeiss LSM510 laser confocal microscope, then analysed using the Metamorph Imaging System (version 6.3). Individual cells (overlay image of both wavelengths) were mapped and pasted into a new image file. The individual images recorded following excitation at both wavelengths (568 nm for GM1 and 488 nm for caveolin-1) were then separated and a lower threshold was set individually for each image to ensure that background fluorescence was reduced to zero. The thresholded (background subtracted) images were then analysed using the quantitative colocalization function of Metamorph software. The total pixel intensity of the thresholded caveolin-1 that colocalized with GM1 was quantified and displayed as a percentage of the total pixel intensity of caveolin-1 staining over the entire cell. This method was used for 10 cells per condition from three separate experiments.

**Quantification of caveolin-1 translocation.** Confocal images of cells stained for endogenous caveolin-1 were imported into Inovision ISEE software. Using this software, a line was drawn by hand around the periphery of each cell, then a second line was drawn ~3.5  $\mu\text{m}$  inside the first line to divide the cell into exterior and interior zones. Average fluorescence intensity was obtained within each subcellular region for 10 cells per condition.

**Quantification of GM1 cell surface fluorescence intensity.** Using ISEE Unix software, CTxB-FITC-surface labelled cells were outlined and the average fluorescence intensity for the entire cell determined for 10 cells per condition.

**Vanadate treatment.** NIH-3T3 or COS-7 cells ( $2 \times 10^5$ ) were plated in 6-well plates, then incubated with or without 1  $\mu\text{M}$  sodium pervanadate (sodium orthovanadate activated with 1:1,000 diluted  $\text{H}_2\text{O}_2$  during 30 min).

**BIND identifier.** One BIND identifier (www.bind.ca) is associated with this manuscript: 316176.

*Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website.*

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. P. Lisanti for the caveolin-1-null MEFs, C. C. Mastick for the caveolin<sup>Y14F</sup> vector, S. Schmid for the dynamin constructs, D. Castle for the Eps15DIII mutant and H68.4 monoclonal antibody, N. Meller for the Cdc42 inhibitor CBD-WASP, W.-P. Li, Y. Ying and J. Redick for assistance in electron microscopy analysis, M. C. Montoya and D. Megías for assistance with the Leica ultra-spectral confocal microscope, E. M. Moreno for technical assistance, and S. Schmid, M. Ginsberg, S. Shattil and K. Ley for critical reading of the manuscript. This work was supported by MEC (Spanish Ministry of Science and Education) through grants SAF2002-0245 and GEN2003-20239-C06-04 to M.A.d.P., a predoctoral fellowship (BEF-2003-2712, to A.G.-G.), and the Ramón y Cajal Program (to M.A.d.P.); and by EUROHORCS (European Heads Of Research Councils) and European Science Foundation (ESF) through a EURYI (European Young Investigator) Award to M.A.d.P.; USPHS grant RO1 GM47214 to M.A.S.; and grants from NIH and the Perot Family Foundation to R.G.W.A. A significant part of this work was performed while some of the authors were located in the Departments of Immunology (M.A.d.P. and N.B.A., from January 2003 to June 2004) and Cell Biology (M.A.d.P., N.B.A. and W.B.K. until June 2004, and M.A.S. until July 2002) at The Scripps Research Institute, CA.

#### COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 7 June 2005; accepted 26 July 2005

Published online at <http://www.nature.com/naturecellbiology>.

- Schwartz, M. A. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *J. Cell Biol.* **139**, 575–578 (1997).
- Edidin, M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283 (2003).
- Lagerholm, B. C., Weinreb, G. E., Jacobson, K. & Thompson, N. L. Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **56**, 309–336 (2005).
- Grande, A., Echarrí, A. & del Pozo, M. A. Integrin regulation of membrane domain trafficking and Rac targeting. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 609–613 (2005).
- del Pozo, M. A. *et al.* Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**, 839–842 (2004).
- del Pozo, M. A., Price, L. S., Alderson, N. B., Ren, X. D. & Schwartz, M. A. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J.* **19**, 2008–2014 (2000).
- Parton, R. G. Caveolae — from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 162–167 (2003).
- Pelkmans, L., Puntener, D. & Helenius, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535–539 (2002).
- Fielding, C. J. & Fielding, P. E. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**, 251–264 (2001).
- Cao, H., Courchesne, W. E. & Mastick, C. C. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 8771–8774 (2002).
- Lee, H. *et al.* Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) *in vivo*: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1750–1775 (2000).
- Engelman, J. A. *et al.* Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem.* **272**, 16374–16381 (1997).
- Fiucci, G., Ravid, D., Reich, R. & Liscovitch, M. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* **21**, 2365–2375 (2002).
- Wiechen, K. *et al.* Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am. J. Pathol.* **159**, 1635–1643 (2001).
- Capozza, F. *et al.* Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am. J. Pathol.* **162**, 2029–2039 (2003).
- Williams, T. M. *et al.* Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis *in vivo*. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J. Biol. Chem.* **279**, 51630–51646 (2004).
- Lee, H. *et al.* Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (–/–) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am. J. Pathol.* **161**, 1357–1369 (2002).
- Murata, M. *et al.* VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 10339–10343 (1995).
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G. & Mayor, S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Dev. Cell* **2**, 411–423 (2002).
- Damm, E. M. *et al.* Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* **168**, 477–488 (2005).
- Razani, B. *et al.* Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* **276**, 38121–38138 (2001).
- Mettouchi, A. *et al.* Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G1 phase of the cell cycle. *Mol. Cell* **8**, 115–127 (2001).
- Boyd, N. D., Chan, B. M. & Petersen, N. O.  $\beta$ 1 integrins are distributed in adhesion structures with fibronectin and caveolin and in coated pits. *Biochem. Cell Biol.* **81**, 335–348 (2003).
- Parton, R. G., Joggerst, B. & Simons, K. Regulated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* **127**, 1199–1215 (1994).
- Aoki, T., Nomura, R. & Fujimoto, T. Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp. Cell Res.* **253**, 629–636 (1999).
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C. & Giancotti, F. G. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**, 625–634 (1998).
- Palazzo, A. F., Eng, C. H., Schlaepfer, D. D., Marcantonio, E. E. & Gundersen, G. G. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* **303**, 836–839 (2004).
- Drab, M. *et al.* Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**, 2449–2452 (2001).
- Sunaga, N. *et al.* Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Res.* **64**, 4277–4285 (2004).
- Machleidt, T., Li, W. P., Liu, P. & Anderson, R. G. Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. *J. Cell Biol.* **148**, 17–28 (2000).





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

European Journal of Cell Biology ■ (■■■■) ■■■–■■■

**European Journal  
of Cell Biology**
[www.elsevier.de/ejcb](http://www.elsevier.de/ejcb)

## Caveolin-1 in cell polarization and directional migration

Araceli Grande-García, Miguel A. del Pozo\*

*Integrin Signalling Lab, Department of Vascular Biology and Inflammation, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain*

Received 18 January 2008; received in revised form 30 January 2008; accepted 1 February 2008

### Abstract

Migration is a complex process in which cells move in a given direction either in response to changes in the extracellular environment or as a consequence of an intrinsic propensity for directional movement. Migration plays key roles in many physiological and pathological processes, including development, angiogenesis, tissue regeneration and metastasis. An important role in migration is played by caveolin-1 and caveolae. Caveolae compartmentalize intracellular signalling pathways to orchestrate cell migration. Caveolin-1 presents a polarized distribution in migrating cells and is linked to the cytoskeleton, and changes in its expression modulate migration. Although there are some discrepancies regarding the regulatory effect of caveolin-1, most studies show that it promotes cell movement and polarity. The importance of caveolin-1 has recently been reinforced by studies with Cav1<sup>-/-</sup> cells, which indicate that it establishes polarity during directional migration by coordinating Src kinase and Rho GTPase signalling.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Caveolin; Polarization; Directional migration; Rho GTPases

### The cell migration machinery and caveolin-1

Migration is a crucial cellular function contributing to many important physiological and pathological processes. It plays a fundamental role during embryogenesis, and defects in this process can result in pathological outcomes such as congenital neurological defects. In the adult, cell migration is a key player in the organization of an effective immune response, in the repair of injured tissues and in angiogenesis, to cite a few examples. Deregulation of migration can lead to many types of disorders including cardiovascular illnesses, chronic inflammatory diseases and metastasis (Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2005).

Two important parameters in cell migration are speed and direction. There are two kinds of directional migration. One is chemotaxis, which is an externally directed migration along a chemoattractant gradient. The other is intrinsic directionality or persistency of migration, which is defined as the internal tendency of cells to continue migrating in the same direction in the absence of exogenous stimuli (Huttenlocher, 2005).

Migration has been defined as a multi-step cyclic process that requires the spatial and temporal coordination of numerous signalling molecules. Among the best-characterized regulators of cell motility are the Rho family of small GTPases, which control two key elements of migration, cytoskeletal rearrangement and the formation of focal adhesions. The principal members of the family are Rac, Cdc42 and Rho. Rac favours lamellipodia formation and membrane ruffling, as well as the establishment of new adhesions at the cell front.

\*Corresponding author. Tel.: +34 91 453 1212;  
fax: +34 91 453 1245.

E-mail address: [madelpozo@cnic.es](mailto:madelpozo@cnic.es) (M.A. del Pozo).

Cdc42 promotes membrane extension to create filopodia. Rho activity is important for the generation of contractile forces at the rear of the cell, as well as for the maturation and disassembly of adhesion structures (Burridge and Wennerberg, 2004; Raftopoulou and Hall, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005; Pertz et al., 2006). Interestingly, by using probes based on the FRET (fluorescence resonance energy transfer) principle, it has recently been shown that Rho activity is concentrated in a sharp band directly at the edge of protrusions of migrating cells (Kurokawa and Matsuda, 2005; Pertz et al., 2006). This suggests that Rho is also required for directional migration and not only for cell contraction as previously thought.

Many reports have provided evidence suggesting a role of caveolae and caveolin in cell migration. Caveolae are specialized plasma membrane invaginations that are highly enriched in cholesterol and sphingolipids (Parton et al., 2006). These membrane domains have been implicated in a wide variety of physiological events; including membrane trafficking, signal transduction, calcium signalling, and lipid recycling (Liu et al., 2002; Echarrri et al., 2007). Caveolin is the principal integral membrane component of these subdomains. Three proteins encoded by the caveolin gene family have been identified. Caveolin-1 and -2 are coexpressed in numerous cell types, whereas caveolin-3 is found only in muscle cells (Salanueva et al., 2007).

Caveolin-1 can influence cell migration through multiple signalling pathways. Caveolin-1 functions as a scaffold to facilitate molecular interactions, thus contributing to the intracellular compartmentalization of signalling pathways involved in cell migration (Isshiki et al., 2002). Among the proteins important for cell motility that are detected in association with caveolae are eNOS, VEGF receptor 2, EGF receptor, PDGF receptor, several regulators of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling such as a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, and members of the Rho family of small GTPases (Navarro et al., 2004; Parton et al., 2006).

A role for caveolin-1 in migration is also supported by its association with stress fibres through the F-actin cross-linking protein filamin (Stahlhut and van Deurs, 2000). Filamin is thought to play a role in cell locomotion, and it may serve as a cytoskeletal linker for transmembrane proteins such as integrins and the glycoprotein I complex (Meyer et al., 1997; Pfaff et al., 1998). Furthermore, caveolin-1 has been proposed to associate with a specific subset of integrins directly (Wary et al., 1998; Wei et al., 1999; Radel et al., 2007). For instance, shear stress induces the formation of a  $\beta 1$  integrin/phosphotyrosine caveolin-1 signalling complex (Radel et al., 2007). Caveolin can also bind to vimentin intermediate filaments in endothelial cells (EC). Although the role of these filaments has been much less studied than that of the actin cytoskeleton, they are thought to be important players in cell migration (Santilman et al., 2007).

## Polarization of caveolin within the cell

In migrating EC, caveolin-1 and caveolae show a polarized distribution (Parat et al., 2003; Beardsley et al., 2005; Sun et al., 2007), supporting a role in cell locomotion. However, this asymmetric distribution differs depending on the matrix topography. In cells migrating on a 2D surface caveolin-1 is excluded from the leading edge and is concentrated at the rear, colocalizing with caveolae. However, in EC transmigration through a filter pore caveolin-1 seems to be released from caveolar structures and is relocalized at an extension protruding from the leading edge, whereas caveolae remain concentrated at the trailing edge (Parat et al., 2003).

Beardsley et al. proposed a mechanism in which the majority of caveolin-1 is concentrated at the trailing edge of migrating cells, where it might prevent lamellipod protrusion, whereas a subpopulation of caveolin-1 phosphorylated on tyrosine 14 localizes to the leading edge, where it may recruit Csk and regulate the formation of focal adhesions (Beardsley et al., 2005). In contrast, Parat et al. showed that although phosphorylation of caveolin-1 on Tyr14 is required for its redistribution to the cell front during three-dimensional migration, it does not affect polarization during planar movement. This apparent discrepancy may be attributable to technical considerations. Parat et al. transiently transfected exogenous caveolin-GFP constructs, showing that wild-type caveolin-1-GFP, but not a non-phosphorylatable Y14F Cav-1-GFP mutant, is able to localize to cell protrusions during 3D migration. In contrast, Beardsley et al. used a monoclonal antibody (mAb) raised against caveolin-1 phosphorylated on Tyr14 (pY14Cav1). A number of other studies have used the same mAb to show localization of phosphorylated caveolin-1 to focal adhesion sites (Mettouchi et al., 2001; Lee et al., 2002; Swaney et al., 2006), which are organized predominantly at the leading edge. Although this mAb shows specific staining for caveolin-1 in suspended cells, with no labelling of detached Cav1<sup>-/-</sup> MEFs (del Pozo et al., 2005), it has been recently reported to recognize tyrosine phosphorylated paxillin in attached fibroblasts in immunostaining assays (Hill et al., 2007). The questionable specificity of the available antibodies for phosphorylated caveolin-1 thus hampers the study of the localization of pY14Cav-1, and careful re-evaluation of these results is needed. Nonetheless, phosphorylation of caveolin-1 on Tyr14 appears to be necessary for binding of caveolin-1 to intermediate filaments, which in turn is required for anterior polarization of phosphocaveolin-1 in transmigration EC (Santilman et al., 2007). However, a more specific approach is needed to define the intracellular distribution of phospho-caveolin during planar migration.

Recently, Sun et al. have identified and characterized a sequence at the N-terminus of caveolin-1 (46TKEIDLVRD<sub>55</sub>) that controls the intracellular distribution of the protein. A caveolin-1 mutant where the 10 residues of this sequence were substituted by alanine (Cav1<sub>46–55A</sub>) failed to show rear polarization. On the other hand, knockdown of caveolin-1 inhibits directional cell migration, which could be rescued by the full-length protein, but not by the Cav1<sub>46–55A</sub> mutant. This result indicates that intracellular polarization of caveolin-1 is crucial for directional migration (Beardsley et al., 2005; Sun et al., 2007).

Several other discrepancies have been observed between signal transduction in 2D versus 3D cultures. Unlike cells on 2D surfaces, which have a flattened morphology, fibroblasts in 3D matrices develop elongated shapes and migrate more rapidly (Bass et al., 2007). Likewise, auto-phosphorylation of focal adhesion kinase is down-regulated in steady-state 3D cultures compared with 2D controls (Cukierman et al., 2002; DeMali et al., 2003). It would be of great interest to compare caveolin intracellular polarization and cell migration patterns in 3D versus 2D in a more specific assay system, for example employing cells embedded in 3D matrices.

### Cell polarization and directional migration regulated by caveolin

Although there are some discrepancies regarding the regulatory effect of caveolin-1 on cell migration, most studies suggest that this protein promotes cell movement and polarity. Knockdown of caveolin-1 expression inhibits EC migration and the ability of EC to invade and form capillaries as the result of a deregulation of the endocytosis of MT1 metalloprotease (Galvez et al., 2004). Caveolin-1 knockdown also impairs chemotaxis of astrocytes towards monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); and stimulation of astrocytes with MCP-1 induces caveolin-1 phosphorylation in these cells (Ge and Pachter, 2004). Similarly, induction of the migration of myeloma cells by vascular endothelial growth factor (VEGF) requires caveolin-1, and VEGF triggers Src-dependent Cav1 phosphorylation (Podar et al., 2004). Finally, Beardsley et al. have shown that RNAi-mediated Cav1 knockdown inhibits cell polarization and impedes cell directional movement in human primary EC, demonstrating that caveolin-1 is crucial for migration (Beardsley et al., 2005).

Cell lines derived from caveolin-deficient mice provide very useful tools for analyzing the role of caveolin-1 in cell motility. For example, studies with Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts have reinforced the importance of caveolin-1 in the establishment of cell polarity during directional migration, through its coordination of signalling by Src

kinase and Rho GTPases (Grande-García et al., 2007). Compared with wild-type mouse embryo fibroblasts (MEFs), Cav1<sup>-/-</sup> MEFs are rounded and show aberrant cytoskeletal architecture, with stress fibres forming concentric cortical actin rings. This phenotype correlates with marked alterations in the basal activity of the Rho GTPases; Rac and Cdc42 are hyperactivated whereas Rho activity is decreased (Grande-García et al., 2007). These findings are in good agreement with others showing that caveolin silencing enhances the basal activity of Rac in EC (Gonzalez et al., 2004). Moreover, Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts show an accelerated turnover of nascent adhesions at protruding areas; this might indicate blockade of the maturation of these structures, which is Rho-dependent (Rottner et al., 1999; Geiger and Bershadsky, 2001). These adhesive complexes were smaller and more abundant in Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts, a finding in accordance with the increased activity of Rac and Cdc42, since these both regulate the initial steps in the formation of small focal complexes (Rottner et al., 1999; Vicente-Manzanares et al., 2005). Furthermore, Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts are characterized by an enhanced protrusive activity throughout the whole cell perimeter. This phenotype is also consistent with the alterations in the GTP loading of Rho GTPases in these cells, since both Rho inactivation and Rac activation promote membrane protrusion (Machesky and Hall, 1997). The mutual antagonism of Rac and Rho is attested by abundant published evidence (Rottner et al., 1999; Burridge and Wennerberg, 2004).

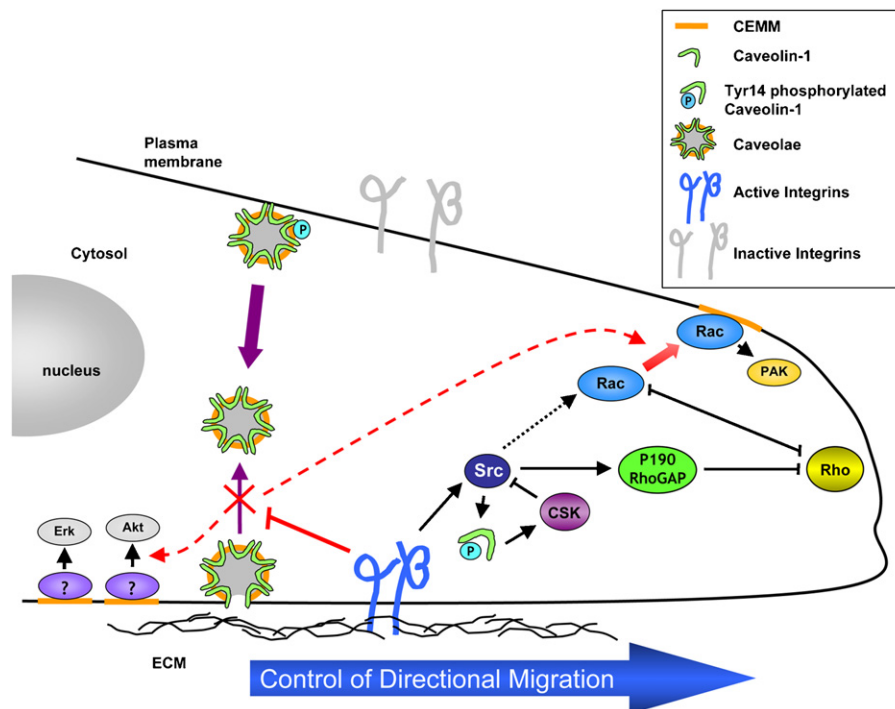
Consistent with the morphological phenotype, Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts fail to establish cell polarity and display a significant defect in directional migration, both externally stimulated and internally persistent (Grande-García et al., 2007). As introduced above, persistence is the intrinsic propensity of cells to continue migrating in the same direction in the absence of an external chemotactic cue (Huttenlocher, 2005). Yamada and co-workers have shown a critical role for Rac in the acquisition of persistence. High Rac activity promotes the formation of peripheral lamellae, which results in random cell movement, with frequent changes in direction, thus resulting in a random pattern of cell migration. Conversely, decreasing Rac activity switches migration from a random to a more directionally persistent pattern (Pankov et al., 2005). Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts show a markedly random migration pattern, consistent with the enhanced Rac activity in these cells (Grande-García et al., 2007). It is important to bear in mind that, concomitant with increased Rac GTP loading, caveolin-1-deficient cells show enhanced Rac plasma membrane targeting (del Pozo et al., 2005), which would be expected to promote an increase in non-polarized protrusion. Combination of both phenotypes would prevent the appearance of a single dominant lamella, and therefore of directional movement. The role

of Rac in directional cell migration in vivo is demonstrated by the impaired migration of keratinocytes at wound sites in Rac1-deficient mice (Tscharnkte et al., 2007).

Several lines of evidence suggest that the aberrant morphology and migratory behaviour of Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts is a consequence of alterations to signalling by Src kinase and Rho GTPases. The increased Src activity displayed by Cav1<sup>-/-</sup> fibroblasts may be attributable to the lack of Cav1-mediated CSK activation (Radel and Rizzo, 2005). Src kinase regulates the activity of Rho GTPases, activating Cdc42 and Rac through multiple pathways (DeMali et al., 2003) and inhibiting Rho via the activation of p190RhoGAP (Arthur et al., 2000) (Fig. 1). Phosphorylation of caveolin-1 on Tyr14 is important for the modulation of these pathways, as shown by the reversal of the phenotype in knock-out fibroblasts by re-expression of wild-type caveolin-1, but not a non-phosphorylatable Y14F Cav1 mutant (Grande-García et al., 2007). Future research is needed, however, to determine the role of

Cav1 phosphorylation in signalling pathways that control cell migration.

Despite these indicators that caveolin-1 is required for directional migration, it is important to highlight that caveolin-1 has also been described as a negative regulator of migration. For instance, caveolin-1 knock-down enhances sphingosine-1 phosphate-stimulated directional migration in bovine aortic EC (Gonzalez et al., 2004). Interestingly, the inhibition of cell migration by caveolin-1 expression in some reports (Zhang et al., 2000; Gonzalez et al., 2004; Hassan et al., 2006) correlates with the slightly faster migration of Cav1<sup>-/-</sup> cells in the absence of an external chemotactic cue (Grande-García et al., 2007). Therefore, some of the apparent discrepancies could be resolved by a detailed analysis of random versus directional migration in each particular system. In other instances, conflicting results can be ascribed to technical or cell-specific issues. For example, caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells have been reported to be slightly more migratory than control cells in wound healing assays (Hassan et al.,



**Fig. 1.** Dual role of pYCav-1 in cell polarity and directional migration through direct (signalling) and indirect (endocytosis) effects. pYCav-1 regulates caveolae endocytosis and integrin-associated signal transduction events. ECM-engaged integrins prevent the internalization of cholesterol-enriched membrane microdomains (CEMMs) mediated by caveolae endocytosis. The retention of CEMMs at the cell surface permits the interaction of many signalling intermediates with their downstream effectors. Rac-mediated PAK activation is dependent on these membrane subdomains, and so are other pathways in which Erk and Akt are implicated (Del Pozo and Schwartz, 2007). Activated integrins also play a more direct role in the regulation of a number of signalling pathways. Integrins can activate Src, which in turn promotes Rac activation through multiple pathways and inhibits Rho via the activation of p190RhoGAP. Caveolin-1 is a substrate of Src, and at the same time it has a negative effect on Src activation. pYCav-1 binds to and activates Csk, which inhibits Src by phosphorylation, concluding a negative feedback loop. In summary, pYCav-1 modulates Rho/Rac GTP loading through direct interaction, and modulates Rac plasma membrane targeting indirectly through an effect on CEMM endocytosis.



2006); but the cells employed in that study express caveolin-3, which may have compensated the lack of caveolin-1. Furthermore, these cells were isolated from mice lacking the *Ink4a* locus, a tumour suppressor gene, which show increased cell proliferation (Hassan et al., 2006), that could accelerate wound-healing. These genotypic and phenotypic differences could dramatically influence the results reported. Another study shows that restoration of caveolin-1 expression in MTLn3 cells inhibits lamellipodial extension and the chemotactic response towards epidermal growth factor (EGF) (Zhang et al., 2000). Nevertheless, caveolin proteins can directly interact with the EGF receptor and inhibit autophosphorylation of the EGF-R kinase, which suppresses signal transduction upon EGF stimulation (Couet et al., 1997). Thus, although the capacity to respond to EGF may be reduced in caveolin-1-expressing MTLn3 cells, the migratory process itself might be unaffected. It would be interesting to analyse migration in the presence of other chemotactic factors.

## Relevance of caveolin to migration in vivo

Several models of caveolin-deficient mice have been generated, which show deregulation of multiple signalling pathways, and consequently display a wide-range of phenotypes (Le Lay and Kurzchalia, 2005). We propose that some of the observed phenotypes could be associated to the in vitro and ex vivo migratory defects summarized above. For instance, *Cav1*<sup>−/−</sup> mice display an impaired angiogenic response to exogenous stimuli (Woodman et al., 2003). Angiogenesis involves both EC migration and proliferation, and separating the contributions of each is complicated. However, and in spite of the increased cellular proliferation rate, matrigel plugs implanted in *Cav1*<sup>−/−</sup> mice show reduced blood vessel formation (Woodman et al., 2003). This suggests that the angiogenic defects in vivo are most likely the result of decreased migration. Supporting this idea, caveolin-1 knockdown leads to an impaired chemotaxis in EC in vitro (Galvez et al., 2004). *Cav1*<sup>−/−</sup> mice also present a delay in cutaneous wound healing in vivo (Grande-García et al., 2007). This process is dependent on numerous cell types (immune-competent cells, keratinocytes, fibroblasts, EC, etc.) and many cellular functions, including directional migration, proliferation and differentiation of epidermal and mesenchymal cells (Singer and Clark, 1999). Directional cell migration seems to play a decisive role in skin wound healing, since it is impaired in spite of the accelerated cell cycle shown by *Cav1*<sup>−/−</sup> cells (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). It is important to bear in mind that although healing is significantly delayed in *Cav1*<sup>−/−</sup> mice, they are able to close their skin wounds (Grande-García et al., 2007).

In spite of the phenotypes described above, *Cav1* null mice are viable, suggesting that caveolin-1 is dispensable for normal embryonic development (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). However, given the intricate network of signalling pathways and regulatory mechanisms involved in cell migration (Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2005), it is very likely that the lack of caveolin is compensated by other signalling pathways. Elucidating such pathways and the mechanism underlying the different phenotypes observed in caveolin-deficient mice is an interesting challenge for future research.

## Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Grant SAF2005-00493 to M.A. del Pozo and predoctoral fellowship BEF-2003-2712 to A. Grande-García), by EUROHORCS (European Heads of Research Councils) and the European Science Foundation (ESF) through a EURYI (European Young Investigator) award to M.A. del Pozo, and by the EMBO Young Investigator Programme. Editorial assistance was provided by Simon Bartlett. The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs and the Pro-CNIC Foundation.

## References

- Arthur, W.T., Petch, L.A., Burridge, K., 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 10, 719–722.
- Bass, M.D., Roach, K.A., Morgan, M.R., Mostafavi-Pour, Z., Schoen, T., Muramatsu, T., Mayer, U., Ballestrem, C., Spatz, J.P., Humphries, M.J., 2007. Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 177, 527–538.
- Beardsley, A., Fang, K., Mertz, H., Castranova, V., Friend, S., Liu, J., 2005. Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J. Biol. Chem.* 280, 3541–3547.
- Burridge, K., Wennerberg, K., 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167–179.
- Couet, J., Sargiacomo, M., Lisanti, M.P., 1997. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J. Biol. Chem.* 272, 30429–30438.
- Cukierman, E., Pankov, R., Yamada, K.M., 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 633–639.
- Del Pozo, M.A., Schwartz, M.A., 2007. Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol.* 17, 246–250.
- Del Pozo, M.A., Balasubramanian, N., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Grande-García, A., Anderson, R.G.,

- Schwartz, M.A., 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol.* 7, 901–908.
- DeMali, K.A., Wennerberg, K., Burridge, K., 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 572–582.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., Schedl, A., Haller, H., Kurzchalia, T.V., 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449–2452.
- Echarri, A., Muriel, O., Del Pozo, M.A., 2007. Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 627–637.
- Galvez, B.G., Matias-Roman, S., Yanez-Mo, M., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F., Arroyo, A.G., 2004. Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 678–687.
- Ge, S., Pachter, J.S., 2004. Caveolin-1 knockdown by small interfering RNA suppresses responses to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 by human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 6688–6695.
- Geiger, B., Bershadsky, A., 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 584–592.
- Gonzalez, E., Nagiel, A., Lin, A.J., Golan, D.E., Michel, T., 2004. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 40659–40669.
- Grande-García, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N.B., Waterman-Storer, C.M., Valdivielso, J.M., del Pozo, M.A., 2007. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J. Cell Biol.* 177, 683–694.
- Hassan, G.S., Williams, T.M., Frank, P.G., Lisanti, M.P., 2006. Caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells show cell autonomous abnormalities in proliferation, migration, and endothelin-based signal transduction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H2393–H2401.
- Hill, M.M., Scherbakov, N., Schiefermeier, N., Baran, J., Hancock, J.F., Huber, L.A., Parton, R.G., Parat, M.O., 2007. Reassessing the role of phosphocaveolin-1 in cell adhesion and migration. *Traffic* 8, 1695–1705.
- Huttenlocher, A., 2005. Cell polarization mechanisms during directed cell migration. *Nat. Cell Biol.* 7, 336–337.
- Isshiki, M., Ando, J., Yamamoto, K., Fujita, T., Ying, Y., Anderson, R.G., 2002. Sites of Ca(2+) wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* 115, 475–484.
- Kurokawa, K., Matsuda, M., 2005. Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol. Biol. Cell* 16, 4294–4303.
- Le Lay, S., Kurzchalia, T.V., 2005. Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 322–333.
- Lee, H., Park, D.S., Razani, B., Russell, R.G., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., 2002. Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (–/–) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am. J. Pathol.* 161, 1357–1369.
- Liu, P., Rudick, M., Anderson, R.G., 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277, 41295–41298.
- Machesky, L.M., Hall, A., 1997. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* 138, 913–926.
- Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J.K., Giancotti, F.G., 2001. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol. Cell* 8, 115–127.
- Meyer, S.C., Zuerbig, S., Cunningham, C.C., Hartwig, J.H., Bissell, T., Gardner, K., Fox, J.E., 1997. Identification of the region in actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein IB $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 272, 2914–2919.
- Navarro, A., Anand-Apte, B., Parat, M.O., 2004. A role for caveolae in cell migration. *FASEB J.* 18, 1801–1811.
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., Yamada, K.M., 2005. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J. Cell Biol.* 170, 793–802.
- Parat, M.O., Anand-Apte, B., Fox, P.L., 2003. Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol. Biol. Cell* 14, 3156–3168.
- Parton, R.G., Hanzal-Bayer, M., Hancock, J.F., 2006. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J. Cell Sci.* 119, 787–796.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., Hahn, K.M., 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069–1072.
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D.J., Ginsberg, M.H., 1998. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 6104–6109.
- Podar, K., Shringarpure, R., Tai, Y.T., Simoncini, M., Sattler, M., Ishitsuka, K., Richardson, P.G., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K.C., 2004. Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Res.* 64, 7500–7506.
- Radel, C., Rizzo, V., 2005. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H936–H945.
- Radel, C., Carlile-Klusacek, M., Rizzo, V., 2007. Participation of caveolae in beta1 integrin-mediated mechanotransduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 626–631.
- Raftopoulou, M., Hall, A., 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* 265, 23–32.
- Razani, B., Engelman, J.A., Wang, X.B., Schubert, W., Zhang, X.L., Marks, C.B., Macaluso, F., Russell, R.G., Li, M., Pestell, R.G., Di Vizio, D., Hou Jr., H., Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G.J., Edelmann, W., Lisanti, M.P., 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276, 38121–38138.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R.,

2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709.
- Rottner, K., Hall, A., Small, J.V., 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* 9, 640–648.
- Salanueva, I.J., Cerezo, A., Guadamillas, M.C., del Pozo, M.A., 2007. Integrin regulation of caveolin function. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 969–980.
- Santilman, V., Baran, J., Anand-Apte, B., Evans, R.M., Parat, M.O., 2007. Caveolin-1 polarization in transmigrating endothelial cells requires binding to intermediate filaments. *Angiogenesis* 10, 297–305.
- Singer, A.J., Clark, R.A., 1999. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738–746.
- Stahlhut, M., van Deurs, B., 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 11, 325–337.
- Sun, X.H., Flynn, D.C., Castranova, V., Millecchia, L.L., Beardsley, A.R., Liu, J., 2007. Identification of a novel domain at the N terminus of caveolin-1 that controls rear polarization of the protein and caveolae formation. *J. Biol. Chem.* 282, 7232–7241.
- Swaney, J.S., Patel, H.H., Yokoyama, U., Head, B.P., Roth, D.M., Insel, P.A., 2006. Focal adhesions in (myo)fibroblasts scaffold adenylyl cyclase with phosphorylated caveolin. *J. Biol. Chem.* 281, 17173–17179.
- Tscharntke, M., Pofahl, R., Chrostek-Grashoff, A., Smyth, N., Niessen, C., Niemann, C., Hartwig, B., Herzog, V., Klein, H.W., Krieg, T., Brakebusch, C., Haase, I., 2007. Impaired epidermal wound healing in vivo upon inhibition or deletion of Rac1. *J. Cell Sci.* 120, 1480–1490.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., Horwitz, A.R., 2005. Cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 4917–4919.
- Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C., Giancotti, F.G., 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94, 625–634.
- Wei, Y., Yang, X., Liu, Q., Wilkins, J.A., Chapman, H.A., 1999. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J. Cell Biol.* 144, 1285–1294.
- Woodman, S.E., Ashton, A.W., Schubert, W., Lee, H., Williams, T.M., Medina, F.A., Wyckoff, J.B., Combs, T.P., Lisanti, M.P., 2003. Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *Am. J. Pathol.* 162, 2059–2068.
- Zhang, W., Razani, B., Altschuler, Y., Bouzahzah, B., Mostov, K.E., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., 2000. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 275, 20717–20725.

# Integrin regulation of membrane domain trafficking and Rac targeting

A. Grande-García<sup>1</sup>, A. Echarri<sup>1</sup> and M.A. Del Pozo<sup>2</sup>

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Ronda de Poniente, 5, 28760 Tres Cantos, Madrid, Spain

## Abstract

Integrins are crucial regulators of essential cellular processes such as gene expression, cell proliferation and migration. Alteration of these processes is central to tumourigenesis. Integrin signals mediate anchorage dependence of cell growth, while growth of cancer cells is anchorage-independent. Integrins critically regulate Rho family GTPases, that are also involved in cell-cycle progression and oncogenesis. In addition to their effect on GTP loading, integrins independently control the translocation of GTP-bound Rac to the plasma membrane. This step is essential for Rac binding to effectors. Integrins increase membrane affinity for Rac, leading to RhoGDI dissociation and effector coupling locally, in the vicinity of activated/bound integrins. Integrin-regulated Rac binding sites are within CEMMs (cholesterol-enriched membrane microdomains). Integrins control Rac signalling by preventing the internalization of its binding sites in CEMMs. Integrin regulation of signalling pathways initiated in CEMMs may be important for the spatial control of cell migration and anchorage dependence of cell growth.

## Introduction

The integrin family of transmembrane receptors mediates cell–cell adhesion and cell attachment to the ECM (extracellular matrix) [1]. Integrins do not possess enzymatic activity. However, activation and/or ligand binding induces integrin clustering that leads to the recruitment of multiple signalling molecules and actin filaments [1]. Integrins regulate multiple pathways, including Erk, PI3K (phosphoinositide 3-kinase), FAK, Src and small Rho GTPases that induce changes in cell polarity, cell migration, cell-cycle progression, gene expression and survival [2,3]. In addition, integrin signals are frequently required for coupling growth factor receptors to downstream effectors [3]. Alteration of these pathways leading to loss of integrin requirement explains anchorage-independent cell growth and increased cell migration and invasion, characteristics that define most metastatic cancer cells [4,5].

Small Rho GTPases regulate multiple processes, including cell migration and polarization, membrane trafficking, cell-cycle progression and gene expression [6,7]. Rho GTPases regulate these processes by interacting with effector molecules that initiate various signalling cascades. Effector molecules interact with activated and GTP-loaded Rho GTPases. GTP loading is regulated by GEFs (guanine nucleotide-exchange factors) that activate the GTPase and by GAPs (GTPase-activating proteins) that inactivate them [7]. GTPases are also regulated by RhoGDIs (where GDI stands

for GDP dissociation inhibitor) that keep them soluble in the cytoplasm by shielding the geranylgeranyl moiety [8] and preventing effector binding [9]. Rac1 is a small Rho GTPase that regulates survival, gene expression, cell-cycle progression, cell migration and cell–cell adhesion [7,10]. Rac function contributes to transformation induced by oncogenes, including Ras, Bcr-Abl, v-Abl and Src [6]. Rac contains a conserved CAAX sequence at the C-terminus, which is modified by a geranylgeranyl moiety [11]. The isoprenoid moiety is inserted into the plasma membrane, allowing Rac to physically associate with the plasma membrane [8,11]. It has recently become clear that integrin-regulated localization of Rac at specific plasma membrane microdomains is critical for binding to and activation of its effector Pak (p21 activated kinase) [12,13].

## Integrins regulate the coupling of Rac with its effector Pak by regulating Rac membrane targeting locally

Rac is activated by growth factors present in serum in suspended and attached cells [14]. Interestingly, Rac activation level in attached cells is higher than in suspended cells. This is due to the effect of integrins on Rac activation. Cell adhesion to fibronectin in the absence of serum induces a transient activation of Rac that is similar to growth factor-induced Rac activation in non-adherent cells. Thus Rac is activated by growth factors present in serum and by cell attachment to the ECM. Notably, both stimuli are independent and accumulative [14,15]. Although Rac GTP loading can be induced by growth factors in an integrin-independent manner, downstream signalling is strictly dependent on integrins. Pak is a Rac effector that is activated by serum in attached cells; however, it is not activated in suspended cells

**Key words:** anchorage-dependent growth, integrin, membrane domain, rac targeting, Rho GTPase, signalling.

**Abbreviations used:** CEMM, cholesterol-enriched membrane microdomain; CTxB, cholera toxin subunit B; ECM, extracellular matrix; FRET, fluorescence resonance energy transfer; GDI, GDP dissociation inhibitor; GPI, glycosylphosphatidylinositol; Pak, p21 activated kinase.

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed (email [madelpozo@cnic.es](mailto:madelpozo@cnic.es)).



after serum stimulation, even though Rac activity is elevated under these conditions [14]. Pak isolated from suspended cells can be activated *in vitro* by Cdc42, which indicates that there are no inherent alterations in Pak under non-adherent conditions. In addition, Pak activity is an adhesion-dependent event in the presence of constitutively activated V12-Rac. This result suggests that factors independent of Rac GTP loading regulate Rac-induced Pak activation [14]. Taken together, these series of experiments indicate that adhesion to the ECM couples Rac with its effector Pak.

Several observations strongly suggest that proper Rac membrane targeting regulates effector coupling and downstream signalling. Rac translocates to the membrane fraction after serum stimulation in adherent cells, but not in suspended cells [14]. This is also the case for V12 Rac, indicating that changes in GTP loading due to integrin-mediated adhesion to the ECM do not determine Rac membrane targeting. A point mutation in the CAAX-membrane targeting motif of V12 Rac prevents Pak activation in adherent cells [14]. Although the CAAX sequence is a major determinant in Rac membrane targeting, a polybasic region (KKRKRK) near the C-terminus contributes significantly to membrane localization of Rac [9]. In addition, membrane binding assays indicate that Rac binds with higher affinity to membranes isolated from adherent cells than from suspended cells [14]. Furthermore, forced membrane targeting of Rac in suspended cells restores Pak activity [14]. These results indicate that Rac-induced Pak activation requires membrane association of Rac. Pak and other effectors also localize to the plasma membrane in activated cells [16] and therefore, it is theoretically possible that effectors drive Rac to the membrane. However, mutations in the Pak binding sequence of Rac do not alter its membrane localization, demonstrating that Pak does not directly recruit Rac to the plasma membrane. Similarly, both mutations that abolish binding to other effectors and competition of effector binding by expression of the Rac/Cdc42 binding domain of Pak (PBD) do not alter Rac membrane localization [9]. Therefore integrin-mediated adhesion to the ECM regulates Rac translocation to membranes in a manner independent of both GTP-loading and effector binding, but dependent on the C-terminal region of Rac. Upon detachment, loss of integrin-mediated adhesion to the ECM prevents Rac from being associated with membranes [14,15]. Abassi and Vuori [17] have shown that CrkII regulates adhesion-dependent Rac membrane targeting but not GTP loading, suggesting that Rac membrane targeting may be a highly regulated process. These observations underscore the importance of Rac plasma-membrane targeting to switch on downstream signalling cascades.

The interaction of Rac and its effector Pak is increased near cell edges and locally induced by integrin stimulation [9]. Micro-injection of activated Rac (GFP-tagged V12-Rac) and Pak (Alexa-546-tagged PBD) shows that both of them distribute homogeneously in both cytoplasmic and membrane regions. However, a FRET (fluorescence resonance energy transfer) signal indicating interaction between the two proteins was only observed at regions near cell edges

[9]. Therefore, in spite of uniform distribution of activated-Rac and the effector domain, they only interact in cell edges, close to areas of integrin activation. As expected, a GFP-Rac effector mutant (Q61L-T35S-Rac), which is activated but deficient in effector binding, shows no increase in the FRET signal at cell edges. Local clustering of integrins induced by fibronectin-coated beads triggers integrin-mediated signals [18]. Using this method, the FRET signal induced by V12Rac, but not Q61L-T35S-Rac, was greater around beads coated with integrins, but not with CD44, a molecule that mediates integrin-independent adhesion [19]. Similar to activated Rac, wild-type Rac also induced a positive FRET signal on anti- $\beta$ 1 integrin- and fibronectin-coated beads. However, this FRET probe does not distinguish integrin-induced Rac activation from targeting, although results with V12-Rac solely represent targeting. Interestingly, a polybasic region and activated mutant (V12-Rac-6Q) deficient in membrane localization, induces significantly lower FRET signal than V12Rac. These results reinforce previous results [14] and show that integrins induce localized targeting of Rac to membranes allowing effector binding.

Binding between Rac and the lipid bilayer is regulated by RhoGDI, which keeps Rac soluble in the cytoplasm by shielding the isoprenoid moiety [8]. RhoGDI binds Rac in the cytosol to prevent both membrane and effector binding [9]. A prenylation deficient and activated Rac mutant (V12-Rac-SAAX), unable to bind either membranes or RhoGDI [8], does not induce a FRET signal near cell edges. Instead, it induces a high FRET signal in the central part of the cell [9]. As expected, fibronectin-coated beads do not induce FRET signal with this Rac mutant [9]. These observations support the idea that RhoGDI binding prevents Rac coupling with effectors in the cytoplasm. Integrins would locally increase the affinity of the plasma membrane for Rac, favouring RhoGDI displacement and allowing Rac effector binding in the vicinity of focal adhesions. In support of this idea, binding between Rac and RhoGDI is higher in suspended than in adherent cells [9].

The effect of integrin signalling on GTPase membrane targeting is not exclusive to Rac. The small Rho GTPase Cdc42 is also translocated to the plasma membrane after agonist stimulation in an integrin-dependent manner [9]. Fractionation studies have shown that Cdc42 is enriched in the particulate fraction in adherent cells, but not in suspended cells. Furthermore, GFP-tagged Cdc42 localizes to membranes after agonist stimulation, mostly in the basal membrane, where integrins are occupied. As occurs with V12-Rac, constitutively activated Cdc42 does not localize to membranes in suspended cells [9], confirming that integrin engagement regulates membrane translocation independent of GTP loading. Recent studies [20] suggest that integrins could also affect the subcellular targeting of Rho.

In summary, these studies showed that integrins, in addition to regulating GTP loading [14,21–23], independently regulate GTP-Rac translocation to the plasma membrane allowing effector binding. GTP-Rac binds better to membranes from adherent cells than from suspended cells, suggesting

that integrins regulate Rac membrane binding sites. These studies did not identify integrin-controlled Rac-binding sites, although others had proposed Rac and Rho to be concentrated in lipid domains in the plasma membrane [24,25].

### CEMMs (cholesterol-enriched membrane microdomains)

Recent models of the plasma membrane predict an organization of the cell surface into heterogeneous lipid-based microdomains co-ordinating a number of cellular functions, including signalling and membrane trafficking [26–28]. These domains are collectively referred to as ‘lipid rafts’ and are envisaged as highly ordered, low density, cholesterol-rich regions [29]. These domains are also enriched in sphingolipids, including gangliosides such as  $G_{M1}$  and lipid-modified proteins such as caveolins, flotillins, Src-family kinases and GPI (glycosylphosphatidylinositol)-linked proteins [26–28]. The term ‘rafts’ is a broad one and probably covers many different types of lipid-based membrane microdomains [30–32] that are still poorly defined [28,33,34]. There is significant uncertainty in understanding the basis for the formation of these microdomains in cell membranes and in estimating their size, density, composition and stability [33,35–38]. Indeed, visualization of native raft domains in living cells has been difficult, questioning their very existence [34]. Clearly, the study of this complex biological problem requires a combination of approaches comprising both model membrane systems and potent imaging techniques applied to membranes in living cells. Promising progress is being made recently by using fluorescence polarization anisotropy [37,39], single-particle tracking [35], FRET [36,40] and quantitative immunoelectron microscopy [38] among other techniques.

### Rac targeting to cholesterol-rich domains

Previous studies had proposed Rac and Rho to be concentrated in lipid rafts and caveolae [24,25], suggesting that integrins could regulate Rac targeting specifically to these domains. Chemical disruption of cholesterol domains with methyl- $\beta$ -cyclodextrin does not alter activation of endogenous Rac [12], but prevents its translocation to the membrane [12,41] and the subsequent activation of Pak [12], mimicking the effects of loss of cell adhesion. Incubation of a recombinant, isoprenylated Rac/RhoGDI complex with plasma membrane fractions purified by using a detergent-free density gradient centrifugation method [42] shows that GTP-Rac binds preferentially to the low-density, cholesterol- and caveolin-enriched fractions [12]. Moreover, GTP-Rac binds specifically to liposomes prepared with an equimolar mixture of phosphatidylcholine (PC), cholesterol and sphingomyelin (Sph), which is in a liquid-ordered state similar to CEMMs [43,44]. Targeting to lipid domains in intact cells can be assessed by labelling the ganglioside  $G_{M1}$  with its natural ligand, CTxB (cholera toxin subunit B). Activated Rac shows a strong co-localization with  $G_{M1}$ , mostly at membrane cell edges [12].

Furthermore, Rac co-aggregates with  $G_{M1}$  clustered with CTxB-coated latex beads. Therefore Rac preferentially associates *in vivo* with  $G_{M1}$ -enriched domains of the plasma membrane. Consistently, studies of fluorescence polarization anisotropy have shown a front-to-back gradient of plasma membrane microviscosity due to cholesterol accumulation at the leading edge of migrating cells [39], where it also co-localizes with Rac [45]. In addition, a peptide encoding Rac1 C-terminus localizes to lipid domains and inhibits Rac localization and function, as measured by membrane ruffling [46]. Moreover, an unbiased quantitative proteomics study revealed Rac1 as a lipid domain-associated protein [47]. In summary, Rac shows a GTP-dependent selective binding to lipid domains, which, at least partially, seems to be determined by lipids themselves.

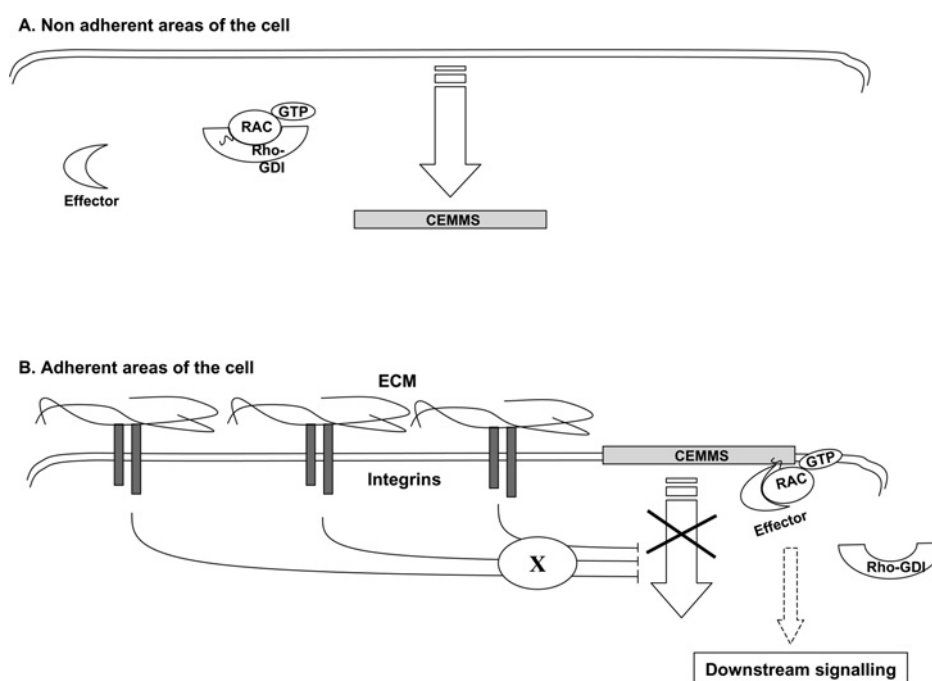
### Integrin regulation of membrane domain localization

These findings led to the hypothesis that CEMMs may be the targets for integrin regulation of Rac translocation to the membrane, as these domains seem to provide the membrane binding sites for Rac. To address this question, effects of integrins on the distribution of CEMMs markers were studied. Loss of integrin-mediated adhesion causes a rapid internalization of several cholesterol-rich domain markers, including cholesterol itself,  $G_{M1}$  and GPI-anchored proteins. The effects are specifically reversed by replating the suspended cells on fibronectin or anti- $\beta 1$  integrin antibodies, but not on non-integrin adhesive substrata. Consistently, local clustering of integrins with beads coated with anti- $\beta 1$  antibodies promotes local accumulation of both  $G_{M1}$  and Rac [12]. Therefore internalization of CEMMs is specifically regulated by integrins. One striking question is whether Rac remains bound to CEMMs after internalization. Existing evidence shows that upon cell detachment and subsequent cholesterol-rich domain internalization, Rac dissociates from the total membrane fraction and remains bound to RhoGDI in the cytoplasm [14]. Therefore Rac and CEMMs probably dissociate after loss of integrin-mediated cell adhesion. Biochemical alterations in the composition of the internalized lipid domains could account for this observation.

These results suggest that the integrin-controlled internalization of CEMMs mediates loss of Rac membrane targeting and downstream signalling upon cell detachment. To test this hypothesis, internalization of  $G_{M1}$ -rich domains in non-adherent cells was blocked artificially by treating cells with CTxB-beads before detachment. Under this condition, non-adherent cells retain plasma membrane association of not only  $G_{M1}$  domains, but also Rac, as well as Rac activation of Pak [12]. These results could also be explained by local recruitment of integrins mediated by CTxB beads and subsequent Rac activation. However, CTxB beads neither recruit integrins nor increase Rac-GTP loading. Therefore internalization of  $G_{M1}$ -rich microdomains from the plasma membrane is required for the loss of Rac targeting and downstream signalling after detachment from the ECM.

**Figure 1 | Model for integrin spatial regulation of Rac downstream signalling**

Integrins regulate Rac signalling spatially by preventing the internalization of Rac binding sites within CEMMs. The cell has been artificially divided into two areas. **(A)** Regions where integrins are not occupied/activated, mimicked experimentally by cells detached from the ECM. In these areas, CEMMs undergo internalization, which prevents Rac plasma membrane localization. Thus Rac remains in the cytoplasm bound to RhoGDI and uncoupled from downstream signalling mediated by effector molecules. **(B)** Zones of the cell where integrins are occupied by ECM-ligand and/or activated. Local activation of integrin signalling through unknown mediators (X) prevents CEMMs internalization locally. Thus in plasma membrane edges near these areas, CEMMs mediate binding of activated Rac, which is able to couple with effectors and trigger downstream signalling. This mechanism could be important for the spatial control of cell migration and anchorage dependence of cell growth.

**Concluding remarks and future directions**

We propose a model based on all these observations (Figure 1). Rac association with the plasma membrane and activation of its downstream effectors requires membrane binding sites that are controlled by integrins. These sites are components of CEMMs. Integrin-mediated adhesion maintains membrane domains at the cell surface. When cells are detached, CEMMs are cleared from the plasma membrane through internalization, disrupting the Rac signalling pathway. Overall, the data indicate that integrins mediate Rac targeting and signalling by inhibiting internalization of Rac binding sites in cholesterol-rich domains (Figure 1).

A similar picture emerges from the observation that integrins control Rho-mediated microtubule stabilization by maintaining  $G_{M1}$ -rich domains at the cell leading edge [48]. Therefore integrins regulate targeting and signalling of at least two pathways (Rac and Rho) by their effects on CEMMs. This finding supports the proposed model of signalling regulation by integrins through internalization of specific membrane microdomains. In fact, an interesting question is

whether internalization of CEMMs might be a mechanism by which integrins influence signalling pathways other than Rac and Rho. Several studies have suggested that many signal transduction pathways highly dependent on integrins are also dependent on lipid domains, such as Ras/Erk, JNK, PI3K-Akt, FAK and Src-family kinases [26,49–51]. These pathways are also implicated in cell-cycle- and anchorage-dependent growth [2,4,5]. It is tempting to speculate that inhibition of domain internalization by integrins could be a key event in anchorage-dependent cell growth. A bypass of the integrin requirement at this level could lead to anchorage-independent growth, characteristic of transformed cells. This is undoubtedly an interesting area of future research.

Other questions that remain unsolved are to elucidate the mechanism by which integrins regulate lipid-domain trafficking (although FAK has been proposed [48], others could also participate), what lipid domains are specifically involved in each pathway, what are the consequences of this mechanism in the control of directed cell migration etc. Finally, it is important to underline that most data discussed here were obtained in anchorage-dependent cells such as

fibroblasts, epithelial and endothelial cells. The fact that Rac does not seem to target to lipid domains in haematopoietic cells [52] underscores the importance of studying integrin-regulation of membrane domains in different cell types.

This work was supported by MEC (Spanish Ministry of Science and Education) through grants SAF2002-0245 and GEN2003-20239-C06-04 (to M.A.D.P.), a predoctoral fellowship (BEF-2003-2712, to A.G.-G.), the Ramón y Cajal Program (to M.A.D.P.), and by EUROHORCS (European Heads Of Research Councils) and European Science Foundation (ESF) through an EURYI (European Young Investigator) Award to M.A.D.P.

## References

- Hynes, R.O. (2002) *Cell* (Cambridge, Mass.) **110**, 673–687
- Assoian, R.K. and Schwartz, M.A. (2001) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 48–53
- Yamada, K.M. and Even-Ram, S. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, E75–E76
- Schwartz, M.A. (1997) *J. Cell Biol.* **139**, 575–578
- Guo, W. and Giancotti, F.G. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 816–826
- Sahai, E. and Marshall, C.J. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 133–142
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) *Nature (London)* **420**, 629–635
- Hoffman, G.R., Nassar, N. and Cerione, R.A. (2000) *Cell* (Cambridge, Mass.) **100**, 345–356
- del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N., Meller, N., Hahn, K.M. and Schwartz, M.A. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 232–239
- Ridley, A.J. (2001) *Dev. Cell* **1**, 160–161
- Seabra, M.C. (1998) *Cell. Signal.* **10**, 167–172
- del Pozo, M.A., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Chiang, H.H., Anderson, R.G. and Schwartz, M.A. (2004) *Science* **303**, 839–842
- Guan, J.L. (2004) *Science* **303**, 773–774
- del Pozo, M.A., Price, L.S., Alderson, N.B., Ren, X.D. and Schwartz, M.A. (2000) *EMBO J.* **19**, 2008–2014
- Symons, M. (2000) *Curr. Biol.* **10**, R535–R537
- Dharmawardhane, S., Sanders, L.C., Martin, S.S., Daniels, R.H. and Bokoch, G.M. (1997) *J. Cell Biol.* **138**, 1–14
- Abassi, Y.A. and Vuori, K. (2002) *EMBO J.* **21**, 4571–4582
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbello, P.D., Akiyama, S.K. and Yamada, K.M. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 791–805
- Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Shao, L. and Chen, Y.W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1829–1838
- Ren, X.D., Wang, R., Li, Q., Kahek, L.A., Kaibuchi, K. and Clark, R.A. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 3511–3518
- Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J.K. and Giancotti, F.G. (2001) *Mol. Cell* **8**, 115–127
- Ren, X.D., Kiosses, W.B. and Schwartz, M.A. (1999) *EMBO J.* **18**, 578–585
- Arthur, W.T., Petch, L.A. and Burridge, K. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 719–722
- Michael, P.A., Mineo, C., Ying, Y.S. and Anderson, R.G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21430–21436
- Kumanogoh, H., Miyata, S., Sokawa, Y. and Maekawa, S. (2001) *Neurosci. Res.* **39**, 189–196
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39
- Anderson, R.G. and Jacobson, K. (2002) *Science* **296**, 1821–1825
- Maxfield, F.R. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 483–487
- Brown, D.A. and London, E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17221–17224
- Roper, K., Corbeil, D. and Huttner, W.B. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 582–592
- Gómez-Mouton, C., Abad, J.L., Mira, E., Lacalle, R.A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Manes, S. and Martínez, A.C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9642–9647
- Gómez-Mouton, C., Lacalle, R.A., Mira, E., Jiménez-Baranda, S., Barber, D.F., Carrera, A.C., Martínez, A.C. and Manes, S. (2004) *J. Cell Biol.* **164**, 759–768
- Edidin, M. (2003) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283
- Munro, S. (2003) *Cell* (Cambridge, Mass.) **115**, 377–388
- Dietrich, C., Yang, B., Fujiwara, T., Kusumi, A. and Jacobson, K. (2002) *Biophys. J.* **82**, 274–284
- Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R.C., Ira, Gousset, K., Krishnamoorthy, G., Rao, M. and Mayor, S. (2004) *Cell* (Cambridge, Mass.) **116**, 577–589
- Gaus, K., Gratton, E., Kable, E.P., Jones, A.S., Gelissen, I., Kritharides, L. and Jessup, W. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 15554–15559
- Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G. and Hancock, J.F. (2003) *J. Cell Biol.* **160**, 165–170
- Vasanji, A., Ghosh, P.K., Graham, L.M., Eppell, S.J. and Fox, P.L. (2004) *Dev. Cell* **6**, 29–41
- Glebov, O.O. and Nichols, B.J. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 238–243
- Grimmer, S., Van Deurs, B. and Sandvig, K. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 2953–2962
- Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C. and Anderson, R.G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10104–10108
- Schroeder, R.J., Ahmed, S.N., Zhu, Y., London, E. and Brown, D.A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1150–1157
- Radhakrishnan, A., Anderson, T.G. and McConnell, H.M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 12422–12427
- Ghosh, P.K., Vasanji, A., Murugesan, G., Eppell, S.J., Graham, L.M. and Fox, P.L. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 894–900
- Van Hennik, P.B., Ten Klooster, J.P., Halstead, J.R., Voermans, C., Anthony, E.C., Divecha, N. and Hordijk, P.L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 19023–19031
- Foster, L.J., De Hoog, C.L. and Mann, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5813–5818
- Palazzo, A.F., Eng, C.H., Schlaepfer, D.D., Marcantonio, E.E. and Gundersen, G.G. (2004) *Science* **303**, 836–839
- Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J.A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R.G. and Lisanti, M.P. (1998) *EMBO J.* **17**, 6633–6648
- Baron, W., Decker, L., Colognato, H. and French-Constant, C. (2003) *Curr. Biol.* **13**, 151–155
- Wei, Y., Yang, X., Liu, Q., Wilkins, J.A. and Chapman, H.A. (1999) *J. Cell Biol.* **144**, 1285–1294
- Pierini, L.M., Eddy, R.J., Fuortes, M., Seveau, S., Casulo, C. and Maxfield, F.R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 10831–10841

Received 22 February 2005